



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN INGENIERÍA QUÍMICA

**UTILIZACIÓN DE LIPASAS
EN LA MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA
DE LECITINAS CRUDAS**

M. Laura Goñi

DIRECTORES

Dra. Amalia A. Carelli

Dra. Diana T. Constenla

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2014

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ingeniería Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Ingeniería Química / de la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI) dependiente de CONICET y la Universidad Nacional del Sur, durante el período comprendido entre Septiembre de 2008 y Septiembre de 2014, bajo la dirección de la Dra. Amalia A. Carelli (Universidad Nacional del Sur) y la Dra. Diana T. Constenla (Universidad Nacional del Sur).

M. Laura Goñi



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/..../..... , mereciendo la calificación de(.....)

A mi mamá

AGRADECIMIENTOS

Los que me conocen, y han tenido la oportunidad de compartir momentos de mi vida en esta etapa “doctoral”, saben lo que significa para mi estar escribiendo estos agradecimientos. Sabrán también cuales son más bien formales (aunque sinceros) y cuales son desde el corazón, aunque a simple vista no parezcan tener relación con el desarrollo de esta tesis.

En primer lugar debo agradecer a la Planta Piloto de Ingeniería Química, a la Universidad Nacional del Sur y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por brindarme el financiamiento y lo necesario para permitir el desarrollo de esta tesis.

Quiero agradecer a los jurados por aceptar corregir este manuscrito.

También quiero agradecer a mis directoras Amalia Carelli y Diana Constenla, por haberse dedicado los últimos meses casi exclusivamente a la corrección de esta tesis. Por la libertad que me han dado a lo largo de este periodo, la ayuda en el desarrollo del trabajo experimental, y en especial por el esfuerzo desinteresado de estos últimos meses.

Al personal de PLAPIQUI, en especial a Elsa (Silva), Ana (Piatoni), Silvia (Raniolo) y Adriana (Ortiz) por hacer su trabajo tan eficientemente, lo que hace que todo funcione tan bien.

A Nora, por su ayuda incondicional, por ser la mamá de todos los becarios, sobretodo de los que somos “extranjeros”, por tener una solución y una sonrisa para todos nuestros problemas. Gracias Nora por alegrarte con nuestros logros y preocuparte cuando algo está mal, y por hacer la vida de todas las personas que pasamos por PLAPIQUI muchísimo más fácil.

A ERASMUS MUNDUS, por las becas otorgadas para financiar mis estadías en Bélgica y en Francia.

A la Universidad de Gante, por aceptarme incluso en condiciones no tan regulares.

Quiero agradecer especialmente a Paul (Van der Meeren), por su gran aporte en lo académico pero también por su apoyo y contención. Por hacer lo posible para que las reglas y estructuras belgas puedan adaptarse a mis necesidades (siempre distintas a las normales). Muchos de los resultados presentados en esta tesis no hubiesen sido posibles de no ser por su guía, y

disposición para trabajar conmigo. A todo el personal del grupo PAINT de la Facultad de Bioingeniería de la UGent. A Saskya, por su ayuda desde el primer día. A Marios, por hacer mas entretenido el trabajo. A los compañeros de laboratorio y oficina, Eric, Quenten, Maryan, y Ana. A Paolo por el trabajo en el laboratorio de NMR. A Mai (Tuyet Nguyen) por la ayuda con la técnica de HPLC. A Nguyen (Bui Thao) y Anant, por brindarme un lugar en sus hogares desinteresadamente.

A Marisa (Yeannes), por ser la primera en fomentar en mí el interés en la investigación y en la docencia.

A mis compañeros del grupo de Alimentos, en especial al personal del laboratorio, Clarisa, Forbito y Federico, por su ayuda en lo experimental.

A Amalia, por haberme alentado en este último tiempo a terminar esta tesis que tanto esfuerzo me costó. Por estar siempre disponible para mis consultas, mis quejas, y mi mal humor, por aprender poco a poco a entenderme, lo cual suele costar, y mucho.

A María Elena, que sin ser mi directora, me ha aconsejado y guiado siempre que pudo, y lo más importante, por brindarme siempre, hasta en los peores momentos, una sonrisa y un abrazo alentadores.

A Consuelo y Camila, por las charlas compartidas, y por su aporte en lo académico. A pesar de compartir conmigo algunas de mis frustraciones, con esfuerzo y dedicación salieron adelante y fueron un ejemplo para mi. Gracias Consu por tu “todo se acomoda” que parece ser una regla general del universo. Gracias también por brindarme desinteresadamente toda la información relacionada con la técnica para la determinación de lípidos neutros, tan útil para el desarrollo de esta tesis.

Al grupo de termodinámica, por permitirme hacer uso y abuso de sus instalaciones, cocina, pava eléctrica, oficinas etc., e incluso de algunas de las personas del grupo.

A los compañeros de PLAPIQUI que me dieron ánimo en cada oportunidad, cada encuentro de pasillo, e incluso a la distancia, como Pocho (Ciolino) y Willy (Mabe), mis psiquiatras preferidos. Gracias Pocho por estar tan pendiente, y por las palabras, el aliento, y los chistes. Willy, gracias miles por tu contención, por las charlas, y por ser tan tierno conmigo.

A los amigos, los bahienses (por nacimiento o por adopción), que lograron hacerme extrañar con mucho cariño mi estadía en Bahía Blanca, y a los otros (marplatenses, porteños, cordobeses y algunos etcéteras).

A los tan bonitos colombianos, Pili y Andrecito, por abrirme siempre las puertas de su casa del ritmo y su corazón, a mi y a la querida bando. Por quererme y aceptarme desde el principio. Por los asados, fiestas, viajes, recitales, charlas, silencios, alegrías y tristezas compartidas, y por todo lo que vamos a seguir compartiendo. A Johanna, la colombiana cordobesa, por su energía desbordante, y ser un sostén en momentos difíciles, casi sin conocerme. Por sus abrazos cósmicos.

A los Pepis, Fran, Pau, y Elisa, por hacerme sentir que no soy la única loca en el mundo. Gracias Eli por prestarme tu oreja tantas veces, por los mates, los recreos, la risa, y los odios compartidos, y por enseñarme a ver siempre la simplicidad de las cosas.

A todos los Cordobeses del IDTQ por adoptarme como una más, por el aguante y por hacer que me vuelvan las ganas continuar mi carrera en investigación, en especial a Raquel, la mami de todos. Gracias por darme un lugar en ese grupo tan lindo donde a veces dan ganas de que sea lunes para ir a trabajar. A Gera, por haber expresado en pocas palabras una de las mejores motivaciones para terminar esta tesis. A Juan M. y José por hacer mi estadía cordobesa más divertida, por hacerse los malos pero quererme en secreto. Y a Juan R. por las charlas compartidas con mates en PLAPIQUI, y con cervezas en Córdoba.

A los compañeros de asados, fiestas, paseos, choripanes en el parque, y partidas de poker. No podría nombrarlos a todos porque seguramente me olvidaría de alguno.

A la mejor compañera de oficina que me haya podido tocar, Danielita la más, por alegrar mis mañanas y dibujarme una sonrisa, quizás en mis peores momentos. Gracias calamity por las charlas, por tu amistad y por tu energía. Por los trencitos, los viajes, las carpas, las frutigran, las minifiestas y el tiro al blanco. Por compartir conmigo ese sueño de andar en ala delta que algún día cumpliremos..

A Anita, por estar desde el comienzo, por las quejas, por la ayuda, por llevarme, por traerme, por bajarme, y levantarme, y por esa sonrisa llena de dientes. Gracias Ani por ser mi compañía en los primeros momentos, y por alentarme tanto para que termine esta tesis. Por los viajes, mates discusiones, las coincidencias y las diferencias, los recitales, y la organización de eventos lúdicos compartidos.

A Sole, que a pesar de no tener nada que ver con este mundo académico me ha acompañado durante todos estos años. Por las carcajadas eternas, los recitales, y los años de amistad, por los negocios compartidos, como la venta de entradas vip, y los emprendimientos teatrales de sombras chinescas en la costa. Gracias solcito por quererme tanto a pesar mis

desapariciones constantes, por estar cuando más te necesité, y a pesar de la distancia seguir siendo mi mejor amiga, siempre.

A Nico, compañero de tantas cosas. Por ser quien me levanta y me sostiene. Por reír y llorar conmigo, por empujarme, y también frenarme cuando hizo falta. Por cuidarme, y hacerme reír, por darme la mano y no soltarme nunca, por la amistad, y por millones de cosas que no entrarían en ninguna tesis, pero que todos los que nos conocen saben perfectamente. Gracias por acompañarme a PLAPIQUI los fines de semana, por esas caminatas por la carrindanga llenas de charlas (que me atraparon tanto que no quise soltarlas nunca más), por ayudarme a ir a Gante sin tener todavía la beca, y por ser el revisor de lujo de todos mis trabajos, incluyendo esta tesis. Gracias también por todo lo demás, lo no académico, por aguantarme todos los días, los malos y los buenos, por enseñarme tanto y hacerme creer que también aprendes conmigo, por tantas (tantas) cosas compartidas, viajes, cocina, cine de los jueves, gatos, rondas de chistes, y sobretodo esta vida nómada que nos lleva y nos trae, pero siempre juntos.

A mis amores peludos, pucky, phoebe, sasha, bando, mandí, y karina, por ser tan tiernos e incondicionales. Por acompañarme y ayudarme secretamente en mis estudios y al escribir esta tesis.

A mis hermanitos. A Diego, por haber sido mi ejemplo durante mis primeros años, una influencia en mi adolescencia y mis primeros contactos con la música, la literatura, el cine, y el mundo real. Gracias por cuidarme y estar siempre pendiente de mi, aunque te guste hacerte el chico malo. A la pequeña y dulce Flor, por haberse convertido en la más adulta de la familia y aconsejarnos y retornos a todos, tan sabiamente. Gracias Flori por tu energía, por tus sonrisas, por llenar de luz los lugares por donde pasás, y por hacerme reír tanto.

Y el último pero el más importante, un agradecimiento enorme a mi mamá, la responsable de todos y cada uno de mis logros, por encontrar el equilibrio perfecto entre dejarme libre y cuidarme a la vez, sin lo cual hubiese sido imposible llegar hasta este punto. Gracias por haber sido siempre un ejemplo de fuerza, perseverancia y amor. Por intentar solucionar cada uno de nuestros problemas, con esa energía de madre que quien sabe de donde sacan.. Por los abrazos, las corridas, las preocupaciones, y por aceptar con una sonrisa la vida de hormiguita viajera que he adoptado desde hace un tiempo. Por los rompecabezas..

RESUMEN

El complejo aceitero argentino es uno de los sectores de la industria alimentaria que ha evidenciado mayor crecimiento durante los últimos años. Localmente se manifiesta una creciente necesidad de producir materiales elaborados con mayor valor agregado, tanto para consumo interno como para exportación. Argentina es uno de los principales productores y exportadores de aceite de girasol (*Helianthus annuus* L.) y la industria local se destaca por su avanzada tecnología y alta competitividad. Los fosfolípidos (PLs) son componentes naturales de las semillas oleaginosas que pasan al aceite durante el proceso de extracción. Estos compuestos deben ser removidos, ya que pueden depositarse durante el transporte o almacenamiento del aceite crudo como así también afectar su estabilidad y características sensoriales. Las gomas, producto del desgomado acuoso de aceites vegetales, constituidas fundamentalmente por agua, PLs y aceite, podrían ser procesadas secas (lecitina cruda) o desaceitadas para obtener productos con un mayor valor agregado adecuados para ser usados como aditivos alimenticios.

En la presente tesis se propone estudiar la modificación de lecitinas vegetales mediante la hidrólisis enzimática de lecitinas crudas utilizando fosfolipasas libres para dar lugar a nuevos productos de interés industrial.

La tesis se estructura en ocho capítulos, en los **Capítulos 1**, y **2** se presenta una introducción teórica que incluye una revisión bibliográfica suministrando al lector los conocimientos básicos sobre el área. En el **Capítulo 3** se detallan los materiales utilizados y la metodología experimental llevada a cabo para las reacciones de hidrólisis y las técnicas analíticas para cuantificación e identificación de los compuestos presentes en el sustrato y los productos. En el **Capítulo 4** se describe el diseño experimental para la hidrólisis enzimática de lecitina cruda de girasol utilizando Lecitase® Ultra como catalizador, se presenta un estudio de las condiciones óptimas o recomendables para la reacción, y se muestran los resultados obtenidos para la caracterización de la materia prima y los productos de hidrólisis, hallándose que no era posible identificar ni cuantificar todas las especies de PLs con las metodologías tradicionales. En el **Capítulo 5** se presenta el desarrollo de una técnica analítica para determinación de PLs y sus formas hidrolizadas mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de fósforo (^{31}P -NMR), junto con una revisión de las distintas técnicas analíticas normalmente utilizadas encontradas en bibliografía. En el **Capítulo 6** se reportan los resultados de la cuantificación de PLs por este método, realizando el seguimiento a diferentes tiempos de hidrólisis. Luego en el **Capítulo 7** se presentan los estudios realizados para evaluar las propiedades estabilizantes de las lecitinas modificadas en un caso específico (emulsiones lácteas) y se analiza cómo varían las propiedades observadas según los distintos grados de hidrólisis y por ende según la composición de las lecitinas.

Finalmente en el **Capítulo 8** se presentan las conclusiones de los estudios realizados en esta tesis, junto con sugerencias de trabajos futuros para su continuación y/o profundización en los temas tratados.

ABSTRACT

In Argentina, the edible oil processing is one of the food industry areas with highest growing levels in the last years. Locally, an increasing demand has arisen for the production of manufactured materials with higher added value, both for internal market and for export. Argentina is one of the major producers and exporters of sunflower oil (*Helianthus annuus* L.), and the local industry is characterized for its advanced technology and high competitiveness. Phospholipids (PLs) are natural components of oily seeds which are extracted along with the oil in the extraction process and must be removed from the oil in order to prevent their settling during crude oil shipping or storing. They also affect oil stability and sensorial properties. Gums, which are by-products from the aqueous degumming of vegetable oils and are constituted mainly by water, PLs and oil, might be processed dried (crude lecithin) or deoiled, in order to obtain products with higher added value, suitable for applications as food additives.

In this thesis, a study concerning the modification of sunflower lecithin by means of enzymatic hydrolysis of crude lecithin using free phospholipases is proposed in order to obtain new products of interest for industrial applications.

The thesis is divided in eight chapters. In **Chapters 1 and 2** a theoretical introduction is presented, including a literature review to provide the reader with the basic concepts on the topic. In **Chapter 3** the materials and experimental methodology used for the hydrolysis reactions, as well as the analytical techniques for the quantitation and identification of the compounds present in the substrate and reaction products are described in detail. In **Chapter 4** the experimental design for the enzymatic hydrolysis of crude sunflower lecithin using Lecitase® Ultra as catalyst is described, presenting a study of the optimal or recommended reaction conditions. Raw material and hydrolysis products characterization results are shown, concluding that it is not possible to identify and quantify all the PLs species with the traditional methodologies. In **Chapter 5** the development of an analytical technique for the determination of PLs and their hydrolyzed forms by phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy (³¹P-NMR) is presented, together with a review of different analytical techniques usually found in the literature. In **Chapter 6** the PLs quantification results using this method are reported for different hydrolysis times. In **Chapter 7** the evaluation of the stabilizing properties of modified lecithins in a specific application (dairy emulsions) is presented, as well as an analysis of the variation of the observed properties for different hydrolysis degrees and therefore for different lecithin composition.

Finally, in **Chapter 8** the conclusions of the thesis are summarized, together with future work suggestions for the continuation and/or deepening of the studied topics.

ÍNDICE GENERAL

PREFACIO	iii
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vii
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xiii
ÍNDICE GENERAL	xv
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	xxiii

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. EL GIRASOL	3
1.2. ACEITE DE GIRASOL	4
1.3. PROCESO DE DE REFINACIÓN DEL ACEITE CRUDO.....	7
1.3.1. ASPECTOS GENERALES	7
1.3.2. DESGOMADO ACUOSO	10
1.4. LECITINAS	13

1.4.1.	COMPOSICIÓN DE LAS LECITINAS	13
1.4.2.	PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS FOSFOLÍPIDOS	15
1.4.3.	CARACTERIZACIÓN DE LECITINAS	21
1.5	PROCESOS DE MODIFICACIÓN DE LECITINAS	22
1.5.1.	MODIFICACIÓN QUÍMICA	23
1.5.2.	MODIFICACIÓN POR FRACCIONAMIENTO	24
1.5.2.1.	REMOCIÓN DE ACEITE RESIDUAL (DEOILING)	24
1.5.2.2.	FRACCIONAMIENTO DE FOSFOLÍPIDOS	24
1.5.3.	MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA	25
1.6.	APLICACIONES DE LAS LECITINAS Y PERSPECTIVAS	28
1.7.	OBJETIVOS DE LA TESIS	32
1.8.	BIBLIOGRAFÍA	34

CAPÍTULO II: EMULSIONES: PROPIEDADES Y FUNDAMENTOS

2.1.	INTRODUCCIÓN.....	41
2.2.	FORMACIÓN DE UNA EMULSIÓN	44
2.3.	ESTABILIDAD DE EMULSIONES	45
2.3.1.	PROCESOS DE DESESTABILIZACIÓN	45
2.3.2.	DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE GOTA	47
2.3.3.	BALANCE HIDROFÍLICO – LIPOFÍLICO	49
2.3.4.	EMULSIONES ESTABILIZADAS POR PROTEÍNAS	51

2.4. BIBLIOGRAFÍA	55
--------------------------------	-----------

CAPÍTULO III: MATERIALES Y METODOLOGÍA ANALÍTICA EXPERIMENTAL

3.1. MATERIALES	62
3.1.1. LECITINA	62
3.1.2. ENZIMA	62
3.1.3. REACTIVOS Y SOLVENTES	63
3.1.3.1. ESTÁNDARES Y REACTIVOS	63
3.1.3.2. SOLVENTES	65
3.1.3.3. OTROS: SOLUCIONES BUFFER	65
3.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA LECITINA CRUDA DE GIRASOL (SIN MODIFICAR)	67
3.2.1. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA GENERAL	67
3.2.2. DETERMINACIÓN DE METALES	68
3.2.3. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE AGs TOTALES EN LOS PLS Y TGs DE LA LECITINA CRUDA DE GIRASOL	70
3.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS	70
3.3.1. PURIFICACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS PREVIO A LA DETERMINACIÓN	70
3.3.1.1. EXTRACCIÓN LÍQUIDO – LÍQUIDO DE ÁCIDOS GRASOS	71
3.3.1.2. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DE SÍLICA GEL (“CLEAN-UP”)	72

3.3.1.3.	EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLS Y LNs	75
3.3.1.4.	VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE PURIFICACIÓN	79
3.3.2.	DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS	83
3.3.2.1.	DETERMINACIÓN DE AGS POR TITULOMETRÍA	83
3.3.2.2.	DETERMINACIÓN DE AGS POR CGC-FID	84
3.3.2.2.1.	PREPARACIÓN DE FAMES	84
3.3.2.2.2.	DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA	85
3.3.3.	DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS NEUTROS	88
3.3.3.1.	DERIVATIZACIÓN DE LAS MUESTRAS	88
3.3.3.2.	DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA	90
3.3.4.	DETERMINACIÓN DE PLS Y LPLS POR HPLC-UV	93
3.4.	BIBLIOGRAFÍA	96

CAPÍTULO IV: HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

4.1.	ESTUDIO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE REACCIÓN	102
4.1.1.	SISTEMA DE REACCIÓN	102
4.1.2.	CONDICIONES ÓPTIMAS DE REACCIÓN	104
4.1.2.1.	MEDIO DE REACCIÓN	106
4.1.2.2.	TEMPERATURA DE REACCIÓN	109
4.2.	SEGUIMIENTO DE LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS	111

4.2.1. ÁCIDOS GRASOS	112
4.2.1.1. CARACTERIZACIÓN DE AGS PRESENTES EN EL SUSTRATO	112
4.2.1.2. SEGUIMIENTO DE LOS AGS LIBERADOS POR HIDRÓLISIS	114
4.2.2. LÍPIDOS NEUTROS	117
4.2.3. FOSFOLÍPIDOS	125
4.3. CONCLUSIONES	134
4.4. DIFUSIÓN DE RESULTADOS	137
4.5. BIBLIOGRAFÍA	138

CAPÍTULO V: DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE ³¹P-NMR PARA LA DETERMINACIÓN DE FOSFOGLICÉRIDOS EN LECITINAS

5.1. INTRODUCCIÓN	144
5.1.1. REVISIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PLS	144
5.1.2. ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	148
5.2. MATERIALES Y EQUIPAMIENTO	152
5.2.1. MATERIALES	152
5.2.2. EQUIPAMIENTO	153
5.3. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA DETERMINACIÓN	155
5.3.1. PREPARACIÓN DE MUESTRA	155
5.3.1.1. EFECTO DEL USO DE DETERGENTES	157
5.3.1.2. EFECTO DEL AGREGADO DE NA-EDTA	159

5.3.1.3.	ELECCIÓN DEL ESTÁNDAR INTERNO PARA LA CUANTIFICACIÓN	163
5.3.1.4.	INFLUENCIA DEL PH	164
5.3.2.	CONDICIONES ÓPTIMAS RECOMENDADAS	165
5.4.	IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LA LECITINA CRUDA DE GIRASOL Y SUS MUESTRAS HIDROLIZADAS	167
5.5.	VALIDACIÓN DEL MÉTODO	173
5.6.	CONCLUSIONES	177
5.7.	DIFUSIÓN DE RESULTADOS	178
5.7.1.	PRESENTACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS	178
5.7.2.	PRESENTACIONES EN CONGRESOS	178
5.8.	BIBLIOGRAFÍA	179

CAPÍTULO VI: SEGUIMIENTO DE FOSFOGLICÉRIDOS EN LA HIDRÓLISIS MEDIANTE ³¹P-NMR

6.1.	MATERIALES Y EQUIPOS	186
6.2.	REACCIÓN DE HIDRÓLISIS	186
6.3.	DETERMINACIÓN CUALI-CUANTITATIVA POR ³¹ P-NMR	188
6.3.1.	COMPOSICIÓN DE FOSFOGLICÉRIDOS EN EL SUSTRATO	189
6.3.2.	COMPOSICIÓN DE FOSFOGLICÉRIDOS EN LA LECITINA MODIFICADA POR HIDRÓLISIS	191
6.4.	COMPARACIÓN CON MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	198
6.5.	DISCUSIÓN	203

6.6.	CONCLUSIONES	210
6.7.	DIFUSIÓN DE RESULTADOS	211
6.7.1.	PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS	211
6.7.2.	PRESENTACIONES EN CONGRESOS	211
6.8.	BIBLIOGRAFÍA	212

CAPÍTULO VII: EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LAS LECITINAS MODIFICADAS

7.1.	INTRODUCCIÓN.....	217
7.2.	MATERIALES	223
7.2.1.	LECITINA CRUDA DE GIRASOL	223
7.2.2.	LECHE EN POLVO DESCREMADA (SMP)	223
7.2.3.	PROTEÍNAS DEL SUERO LÁCTEO (WPI)	223
7.2.4.	ACEITE DE GIRASOL	224
7.2.5.	BUFFER CA-IMIDAZOL	224
7.3.	METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DEL SISTEMA A	225
7.3.1.	PREPARACIÓN DE LAS EMULSIONES	225
7.3.2.	TRATAMIENTO TÉRMICO	226
7.3.3.	MEDICIONES DE VISCOSIDAD	226
7.3.4.	DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA	227
7.4.	METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DEL SISTEMA B	228
7.4.1.	CONTENIDO DE PROTEÍNA RESIDUAL	228

7.4.2.	ENSAYOS DE REOLOGÍA OSCILATORIOS	229
7.5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	229
7.5.1.	EFFECTO DE LA LECITINA DE GIRASOL SIN MODIFICAR EN LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE LAS EMULSIONES	229
7.5.2.	IMPACTO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN LA ESTABILIDAD TÉRMICA Y EFECTO DEL GRADO DE HIDRÓLISIS	236
7.5.2.1.	SISTEMA A: EMULSIONES DE LECHE CONCENTRADA RECONSTITUIDA ..	238
7.5.2.2.	SISTEMA B: SUSPENSIÓN DE PROTEÍNA DE SUERO LÁCTEO	241
7.6.	CONCLUSIONES	248
7.7.	DIFUSIÓN DE RESULTADOS	250
7.7.1.	PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS	250
7.7.2.	PRESENTACIONES EN CONGRESOS	250
7.8.	BIBLIOGRAFÍA	251

CAPÍTULO VIII: CONCLUSIONES GENERALES Y TRABAJO FUTURO

8.1.	CONCLUSIONES GENERALES	257
8.2.	TRABAJOS FUTUROS	260

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS:

TABLA 1.1. Composición de lecitinas desaceitadas de diferentes fuentes	14
TABLA 1.2. Composición de ácidos grasos de lecitinas y aceites de soja y girasol	15
TABLA 3.1. Especificaciones técnicas de la enzima utilizada como catalizador para las reacciones de hidrólisis.....	63
TABLA 3.2. Solventes orgánicos utilizados en las determinaciones analíticas y reacciones de hidrólisis	66
TABLA 3.3. Caracterización química general de lecitina cruda de girasol.....	68
TABLA 3.4. Contenido de metales en la lecitina cruda de girasol.....	69
TABLA 3.5. Técnica de clean-up tomada como referencia para la purificación de AGLs en las muestras de lecitina de girasol	73
TABLA 3.6. Condiciones operativas del proceso de liofilización de muestras de lecitina cruda de girasol.....	77
TABLA 3.7. Resumen de la metodología implementada para la determinación de AGs en la lecitina cruda de girasol.....	87

TABLA 3.8. Resumen de la metodología implementada para la determinación de lípidos neutros en la lecitina cruda de girasol	91
TABLA 3.9. Programación de la Fase Móvil utilizada en la determinación de PL y LPL mediante HPLC-UV	94
TABLA 3.10. Resumen de la metodología implementada para la determinación de PLs y LPLs.....	95
TABLA 4.1. Ácidos grasos liberados luego de 1 h de reacción para cada conjunto de variables estudiado	107
TABLA 4.2. Composición de ácidos grasos de lecitina cruda de girasol.....	113
TABLA 4.3. Composición de los principales AGLs en la lecitina nativa y modificada a distintos grados de hidrólisis	115
TABLA 4.4. Contenido de lípidos neutros en la lecitina nativa y modificada mediante hidrólisis a distintos tiempos de reacción.....	122
TABLA 4.5. Composición de PC y LPC en lecitina nativa e hidrolizada a diferentes tiempos de reacción, determinada por HPLC-UV.....	128
TABLA 4.6. Composición de PI y LPI en lecitina nativa e hidrolizada a diferentes tiempos de reacción, determinada por HPLC-UV.....	129
TABLA 4.7. Composición de PE y LPE en lecitina nativa e hidrolizada a diferentes tiempos de reacción, determinada por HPLC-UV.....	131
TABLA 5.1. Características de los compuestos puros utilizados para la identificación de señales y verificación del método propuesto.....	154
TABLA 5.2. Transparencia lograda en muestras de lecitina cruda en agua, según la cantidad de deoxicolato utilizada	158
TABLA 5.3. Especificaciones para el método propuesto de determinación de PLs y sus formas hidrolizadas mediante ³¹P-NMR.....	166

TABLA 5.4. Diferencia de resonancia ($\Delta\delta$) para las distintas especies de PLs con respecto a su correspondiente LPL.....	172
TABLA 5.5. Comparación entre la pureza de muestras comerciales y la determinada experimentalmente, a partir de muestras de concentración conocida de PLs y LPLs.....	174
TABLA 5.6. Error relativo en la cuantificación por ^{31}P-NMR de PL, LPL, y GPL a partir de muestras comerciales de concentración conocida sometidas a hidrólisis enzimática con Lecitase[®] Ultra.....	176
TABLA 6.1. Composición de PLs y LPLs en la lecitina cruda de girasol utilizada como sustrato de hidrólisis, determinada por ^{31}P-NMR.....	191
TABLA 6.2. Composición de fosfoglicéridos en la lecitina cruda de girasol nativa e hidrolizada con distintos tiempos de reacción.....	193
TABLA 6.3. Programación de la fase móvil utilizada en la determinación de PLs y LPLs mediante HPLC-ELSD.....	199
TABLA 6.4. Comparación de la determinación de PLs y LPLs mediante el método sugerido de P-NMR y HPLC-ELSD, para lecitina nativa.....	202
TABLA 6.5. Comparación de la determinación de PLs y LPLs mediante el método sugerido de P-NMR y HPLC-ELSD, para lecitina hidrolizada con Lecitase[®] Ultra durante 20 min.....	203
TABLA 6.6. Composición de PLs y LPLs en la lecitina modificada por hidrólisis enzimática, determinada por ^{31}P-NMR.....	208
TABLA 7.1. Índices de consistencia y comportamiento de flujo calculado para muestras de leche evaporada reconstituida con el agregado de lecitina nativa, calentadas a 121 °C.....	231
TABLA 7.2. Contenido de PLs y LPLs en la lecitina cruda nativa y modificada mediante hidrólisis enzimática.....	237

FIGURAS:

FIGURA 1.1. Promedio diario de producción de aceite refinado de girasol en Argentina durante el período 2008-2013.....	5
FIGURA 1.2. Esquema del proceso de extracción de aceite de girasol a partir de las semillas.....	6
FIGURA 1.3. Esquema del proceso de refinación químico de aceites vegetales.....	8
FIGURA 1.4. Esquema del proceso de desgomado acuoso	11
FIGURA 1.5. Estructura de los fosfolípidos principales presentes en lecitinas de origen vegetal.....	16
FIGURA 1.6. Estructura y comportamiento de moléculas anfipáticas	19
FIGURA 1.7. Ejemplo del comportamiento de PLs y LPLs en la interfase de una emulsión.....	20
FIGURA 1.8. Distintos tipos de lipasas y fosfolipasas utilizados para la modificación enzimática de lecitinas, según su especificidad.....	26
FIGURA 1.9. Esquema de moléculas de PLs y LPLs y ejemplos de su nomenclatura según la posición del ácido graso.....	27
FIGURA 1.10. Importaciones de lecitina de la Unión Europea provenientes de los países exportadores más importantes, en el período 2002-2012	31
FIGURA 2.1. Representación esquemática de diferentes tipos de emulsiones según sus fases dispersa y continua.....	42
FIGURA 2.2. Esquema representativo de la disposición de las proteínas, monoglicéridos y lecitinas, al emulsionar una gota de aceite en una fase continua acuosa	43

FIGURA 2.3. Esquema de los mecanismos de desestabilización de emulsiones más comunes.....	46
FIGURA 2.4. Valores de HLB para diferentes tipos de lecitinas nativas y modificadas.....	51
FIGURA 2.5. Representación esquemática de la estructura que podrían presentar los agregados en una emulsión láctea o/w sometida al calor.....	53
FIGURA 3.1. Esquema del “clean-up” o purificación de AGLs por cromatografía en columna de sílica-gel	75
FIGURA 3.2. Extracción y purificación de las fases polar (PL+LPL) y apolar (TG+DG+MG y AGL), como preparación de las muestras previo a la determinación cromatográfica	79
Figura 3.3. Placa de TLC para la verificación del método de purificación por cromatografía en columna o clean-up.....	81
FIGURA 3.4. Placa de TLC para la verificación del método SPE (cartuchos de fase diol)	82
FIGURA 3.5. Reacción de metilación de AGs para la preparación de sus correspondientes metilésteres (FAMES) en medio ácido	84
FIGURA 4.1. Esquema del sistema de reacción	102
FIGURA 4.2. Distribución del tamaño de partícula para el medio de reacción según el tiempo de agitación (Sin enzima).....	104
FIGURA 4.3. Liberación de ácidos grasos luego de 1 h de hidrólisis, para diferentes condiciones de reacción.....	108
FIGURA 4.4. Curva de liberación de AGs durante la hidrólisis de lecitina con Lecitase® Ultra, para T=50 °C y T=60 °C	110

FIGURA 4.5. Perfil de ácidos grasos liberados en la hidrólisis de lecitina a distintos tiempos de reacción	116
FIGURA 4.6. Nomenclatura utilizada para monoglicéridos y diglicéridos, según la posición y el tipo de AG	119
FIGURA 4.7. Cromatogramas de muestras de lecitina cruda nativa y modificada luego de 60 min de reacción. (Zona correspondiente a MGs).....	120
FIGURA 4.8. Cromatogramas de muestras de lecitina cruda nativa y modificada luego de 60 min de reacción (Zona correspondiente a DGs)	121
FIGURA 4.9. Reacción de hidrólisis de lípidos neutros catalizada por Lecitase® Ultra.....	123
Figura 4.10. Ejemplo de cromatograma para la determinación de PLs y LPLs mediante HPLC-UV, en lecitina cruda de girasol modificada con un tiempo de hidrólisis de 60 min	126
FIGURA 5.1. Espectro de ³¹P-NMR correspondiente a lecitina de girasol hidrolizada utilizando PLA₂.....	151
FIGURA 5.2. Transparencia de muestras con 2% lecitina y 0 a 10% deoxicolato, a temperatura ambiente.....	159
FIGURA 5.3. Comparación de espectros obtenidos por ³¹P-NMR para muestras de lecitina nativa, con y sin el agregado de Na-EDTA, a idénticas concentraciones de lecitina	160
FIGURA 5.4. Densitometría de una solución acuosa de deoxicolato al 10%, en un rango de temperaturas de 10 a 60 °C	162
FIGURA 5.5. Espectros de ³¹P-NMR de muestras de lecitina nativa con Na₂HPO₄, y PMG como estándares internos para la cuantificación.....	164
FIGURA 5.6. Espectros de ³¹P-NMR correspondientes a muestras comerciales de C-18-LPC y PC, esta última hidrolizada con Lecitase® Ultra	168

FIGURA 5.7. Espectros de ³¹P-NMR para lecitina y sus muestras hidrolizadas para 20 min y 24 h de reacción.....	170
FIGURA 5.8. Espectro de ³¹P-NMR de una mezcla de PLs a pH 10,6; mostrando las diferencias de resonancias entre los PLs y sus correspondientes LPLs	171
FIGURA 6.1. Espectros de ³¹P-NMR para lecitina nativa y modificada con tiempos de reacción de 20 min, 60 min, 360 min y 24 h.....	190
FIGURA 6.2. Evolución de las distintas especies de fosfoglicéridos con el tiempo de hidrólisis.....	194
FIGURA 6.3 Detalle de espectros de ³¹P-NMR para lecitinas modificadas con tiempos de reacción de 20 min, 60 min, 360 min, y 24 h.....	195
FIGURA 6.4. Disminución del contenido de fosfolípidos durante la hidrólisis de lecitina cruda de girasol	196
FIGURA 6.5. Evolución del contenido de lisofosfolípidos durante la hidrólisis de lecitina cruda de girasol	197
FIGURA 6.6. Ejemplos de cromatogramas obtenidos por HPLC-ELS de lecitina cruda de girasol nativa e hidrolizada durante 20 min con Lecitase® Ultra	200
FIGURA 6.7. Reacción de hidrólisis de fosfolípidos utilizando Lecitase® Ultra como catalizador enzimático.....	205
FIGURA 6.8. Posible mecanismo de acil-migración en medio ácido.....	206
FIGURA 7.1. Índices de consistencia calculados para la emulsión sin lecitina y con el agregado de 0,3% de lecitina, en función del tiempo de calentamiento	232
FIGURA 7.2. Diámetro promedio de partícula (D_{4,3}) de las emulsiones con lecitina nativa según la intensidad del tratamiento térmico	233

FIGURA 7.3. Distribución diferencial de tamaño de partícula para emulsiones con agregado de lecitina sin modificar, a distintos tiempos de calentamiento	235
FIGURA 7.4. Viscosidad de las emulsiones luego del tratamiento térmico en función de la velocidad de deformación, para muestras sin emulsionante, y con el agregado de lecitina cruda nativa, y modificada con distintos tiempos de hidrólisis.....	239
FIGURA 7.5. Distribución de tamaño de partícula acumulado para emulsiones de leche concentrada reconstituida con y sin agregado de lecitina cruda nativa e hidrolizada a distintos tiempos de reacción.....	240
FIGURA 7.6. Contenido de proteína residual en soluciones de proteína de suero lácteo (WPI) sometidas a tratamiento térmico por 1 y 2 minutos, con o sin el agregado de lecitina nativa y modificada	242
FIGURA 7.7. Muestras de suspensión de proteína de suero lácteo sin calentar, y sometidas a calentamiento, sin el agregado de lecitina, con 1% lecitina cruda nativa o 1% de lecitina hidrolizada ($t_h = 20$ min).....	244
FIGURA 7.8. Módulo complejo G^* para soluciones de proteína de suero lácteo (WPI) con y sin el agregado de lecitina cruda nativa e hidrolizada ($t_h = 20$ min).....	246

CAPÍTULO I:

INTRODUCCIÓN

Donde habrá quedado aquella niña inquieta y curiosa... habrá olvidado bajarse de algún árbol... o de alguna nube? A veces pienso que corría tan fuerte que logró escaparse... (siempre fue mucho mas inteligente que yo...)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL GIRASOL

El girasol (*Helianthus annuus L.*) es una especie de la familia de las Asteraceae, originaria de América del Norte. Su nombre deriva del griego “*helios*” que significa *Sol*, y “*anthos*” que significa *Flor*. Esta planta fue introducida en Europa en el siglo XVI, y comenzó a tener importancia como oleaginosa a comienzos del siglo XVIII, en Inglaterra. Su cultivo se extendió rápidamente por Europa, pero fue en Rusia donde tuvo lugar el primer desarrollo importante para su utilización como alimento y producción de aceite comestible (Sánchez-Muniz & Cuesta, 2003; Grompone, 2005).

Según la Asociación Argentina de Grasas y Aceites (ASAGA, 2014), la producción mundial de girasol del año 2013 fue de 42,86 millones de toneladas, siendo la producción argentina de 2,9 millones, es decir, aproximadamente un 7% de la producción mundial, y ubicándose en el cuarto lugar, lo que muestra la importancia de esta oleaginosa para nuestro país.

La producción de girasol a nivel mundial tiene cuatro principales protagonistas: Ucrania, la Federación Rusa, la Unión Europea y Argentina, el único país relevante en el hemisferio sur. En Argentina el girasol se cultiva principalmente en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Chaco y La Pampa, con algo de participación del sur de la provincia de Córdoba. El 92% del grano de girasol producido en la Argentina es procesado. El 70% de ese valor se exporta como aceite crudo a granel y harina proteica y el 30% restante como aceite refinado. A partir del girasol se extrae un 42% de aceite, 42% de subproductos y 7% de desperdicio (Guiotto, 2014).

1.2. ACEITE DE GIRASOL

El aceite de girasol es uno de los principales aceites comestibles -tanto en volumen de producción como de consumo- en la República Argentina. En la **Figura 1.1** se muestra el promedio de litros de aceite refinado producidos por día en Argentina durante los últimos años (2008-2013) (Franco, 2014).

El rendimiento industrial de la obtención de aceite a partir de la semilla, así como la calidad y composición del aceite obtenido, depende tanto de factores ambientales como operativos a nivel industrial.

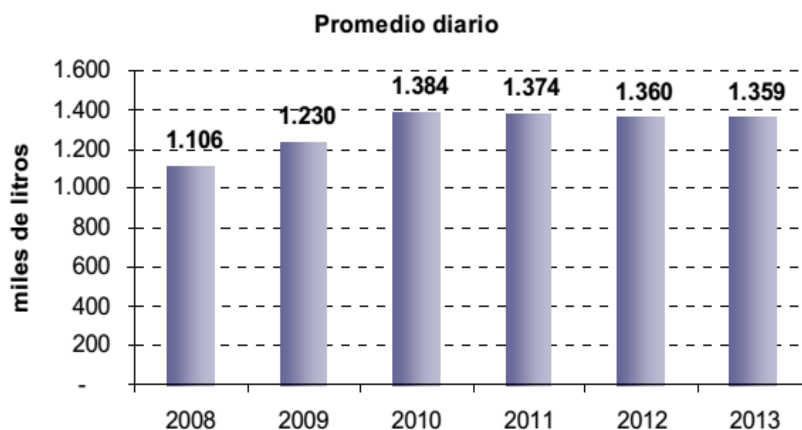


Figura 1.1. Promedio diario de producción de aceite refinado de girasol en Argentina durante el período 2008-2013. (Tomado de Franco, 2014)

En la **Figura 1.2** se muestra un esquema del proceso de extracción de aceite de girasol. La producción de aceite de girasol comienza con la recepción de las semillas, las cuales deben ser almacenadas en condiciones óptimas de humedad y temperatura de manera de minimizar el deterioro. El proceso de extracción de aceite normalmente comienza con un prensado de las semillas descascaradas (pepas) y acondicionadas, obteniéndose una primera fracción de aceite. La torta residual del prensado contiene un alto porcentaje de aceite, y es sometida a un proceso posterior de extracción con solvente (generalmente hexano). Normalmente estas dos fracciones se mezclan obteniéndose el denominado *aceite crudo*. Sin embargo el *aceite crudo de prensa* puede refinarse y comercializarse con la denominación de *aceite virgen de prensado* o sólo *aceite virgen* (Grompone, 2005).

Los aceites vegetales crudos están constituidos mayoritariamente por triglicéridos (TGs). Estos compuestos ampliamente conocidos están formados por una molécula de glicerol esterificada con tres moléculas de ácidos grasos (AGs). Sin embargo, existen en el aceite pequeñas cantidades de componentes no triglicéricos, como los fosfolípidos (PLs), esteroides, tocoferoles, carotenoides, clorofilas, mono y diglicéridos (MGs y DGs) y ácidos

grasos libres (AGLs), que pueden estar presentes en diferentes cantidades conforme las características y calidad de la materia prima de origen.

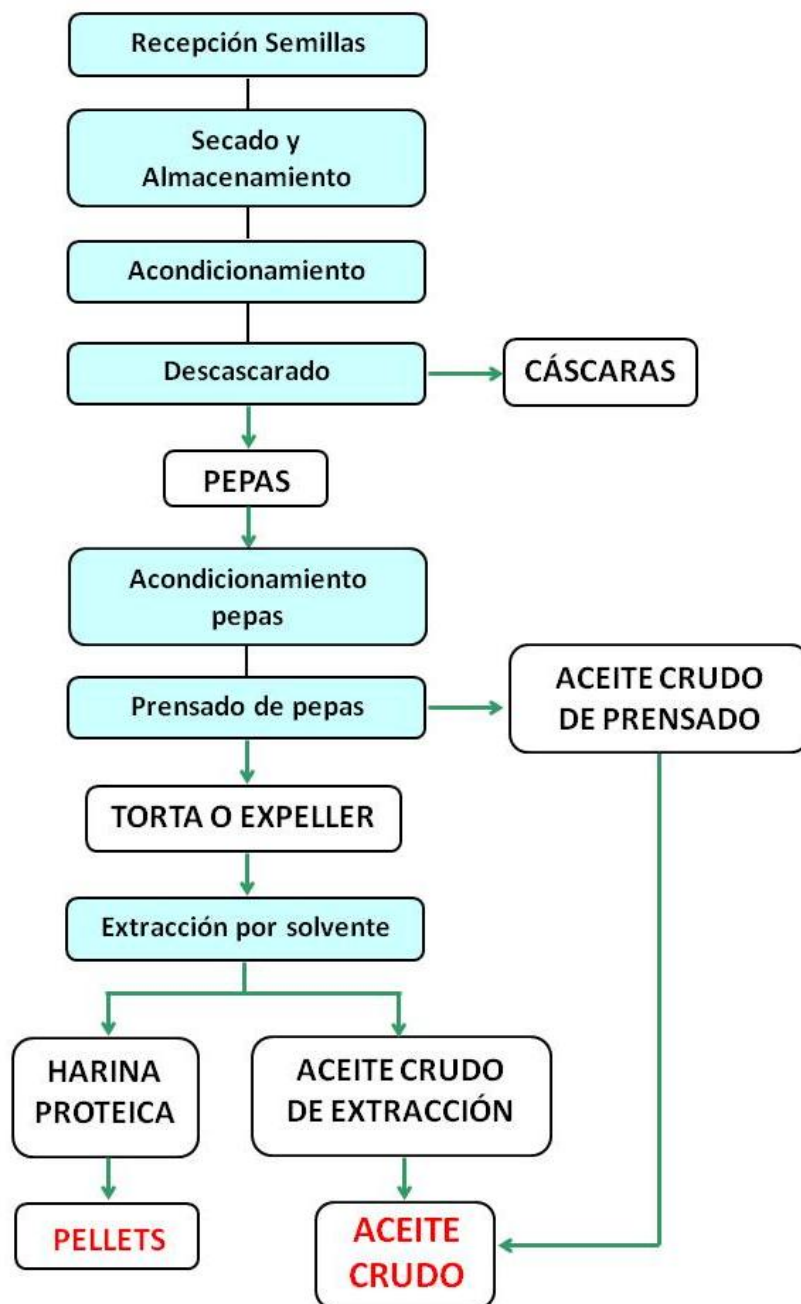


Figura 1.2. Esquema del proceso de extracción de aceite de girasol a partir de las semillas (Adaptado de Melgarejo, 2003)

Dependiendo del método de extracción utilizado variará la composición del aceite obtenido, pero en todos los casos, los mencionados componentes minoritarios pueden afectar su estabilidad durante el almacenamiento. Por ello, el aceite crudo debe someterse a un proceso de refinación posterior que permita la remoción de estos compuestos indeseados y así mejorar la estabilidad, palatabilidad y calidad del producto final (Melgarejo, 2003; Grompone, 2005; Cabezas, 2010).

1.3. PROCESO DE REFINACIÓN DEL ACEITE CRUDO

1.3.1. ASPECTOS GENERALES

La refinación del aceite crudo contribuye a la obtención de un producto con características organolépticas aceptables, tales como sabor y olor suaves, aspecto límpido y color claro, a la vez que permite la remoción de ciertos compuestos minoritarios como iones metálicos o productos de oxidación, que pueden ser nocivos para la salud del consumidor. La importancia de esta etapa radica en que la calidad y la estabilidad de los aceites vegetales son los factores más importantes en la aceptación del producto final por parte del consumidor (Brevedan y col., 2000; Givon & Tirtiaux, 2000)

La **Figura 1.3** muestra las principales etapas de un proceso de refinación químico de aceites vegetales.

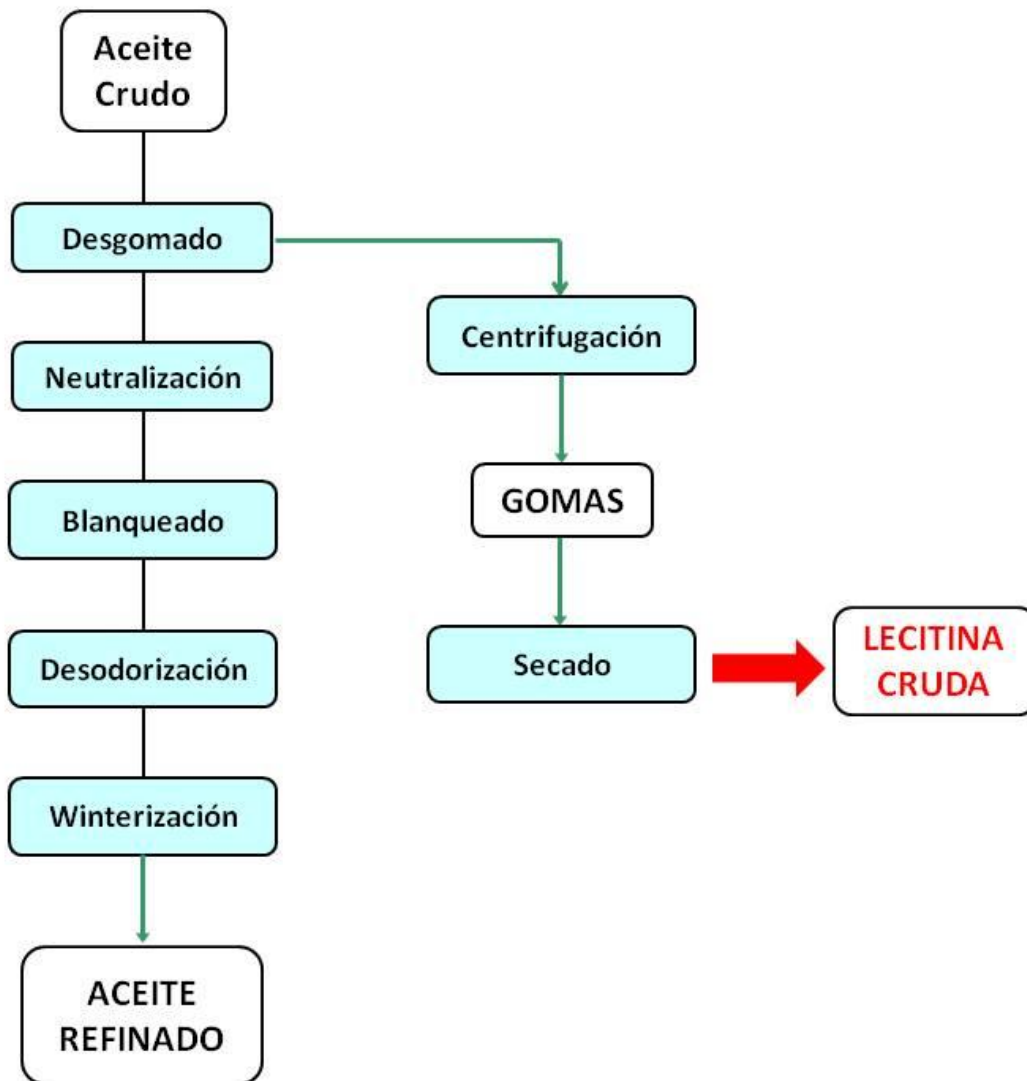


Figura 1.3. Esquema del proceso de refinación química de aceites vegetales.

El *Desgomado* es la primera etapa del refinado y consiste en la remoción de material hidratable, como gomas (fosfolípidos), ceras mucilaginosas, sustancias proteicas, coloides o partículas pequeñas en emulsión, etc., que con el tiempo pueden polimerizar y/o precipitar, disminuyendo el rendimiento en las etapas subsiguientes y la calidad final del aceite (Erdelyi, 1988; Dijkstra & van Opstal, 1989). La *Neutralización* consiste en agregar un ligero exceso de una solución de hidróxido de sodio a fin de neutralizar los ácidos grasos libres (responsables

de la acidez del aceite). El material resultante pasa por centrifugas y allí se separan el aceite neutro y las “borras de neutralización” (Guiotto, 2014). En la etapa de *Blanqueado* se elimina la clorofila (un poderoso pro-oxidante del aceite), a la vez que se destruyen los hidroperóxidos, se adsorben algunos de los productos secundarios de oxidación y parte de los compuestos coloreados. La etapa de *Desodorización* se utiliza para remover los compuestos volátiles, principalmente aldehídos y cetonas, mediante destilación por arrastre con vapor a bajas presiones (Dudrow, 1983). Por último la *Winterización o Descerado* consiste en la insolubilización de ceras por cristalización mediante la disminución de la temperatura. Esta es una etapa de gran importancia ya que la presencia de ceras en aceites vegetales puede traducirse en una apariencia turbia en el aceite a temperatura ambiente, lo cual es un atributo no deseable para el consumidor. Luego de esta etapa y durante su vida útil, el aceite no debe poseer turbidez aún a bajas temperaturas (Carelli y col., 2002b; Grompone, 2005).

Además de la refinación química descrita, existe también otro tipo denominada *Refinación Física*. Mas detalles sobre procesos de obtención industrial del aceite de girasol pueden consultarse en Givon & Tirtiaux (2000), y Carrín & Carelli (2010).

En la actualidad existe un gran interés en la revalorización de los subproductos del proceso de obtención de aceite e incluso de sus desechos y subproductos (Stepycheva y col., 2012). En nuestro país, debido al gran volumen de producción de aceite de girasol, la revalorización de los subproductos generados en el proceso de extracción y/o refinación constituye una interesante oportunidad. Entre estos subproductos se encuentran las gomas, constituidas por una mezcla de fosfolípidos, agua y restos de aceite. La posterior deshidratación de las mismas da lugar al subproducto denominado *lecitina*. Cada fosfolípido constituyente

contribuye a la funcionalidad de la lecitina, por lo que la modificación de su estructura y/o de su concentración posibilita ampliar las propiedades funcionales de la misma.

1.3.2. DESGOMADO ACUOSO

Existen en la actualidad distintas metodologías que pueden utilizarse para la etapa de desgomado de aceites vegetales. Entre las más comunes se encuentran el desgomado con agua, el desgomado ácido, el desgomado “soft” y el desgomado enzimático.

La lecitina de girasol utilizada en esta tesis proviene de un proceso de desgomado acuoso, por lo que esta metodología se explicará con mayor detalle. Una revisión de todos los métodos utilizados para el desgomado puede consultarse en Dijkstra & van Opstal (1989); Givon & Tirtiaux (2000); Dijkstra (2011b).

El desgomado acuoso involucra el tratamiento térmico del aceite crudo con agua. El principio del método se basa en la hidratación de los fosfolípidos y el material mucilaginoso con el propósito de reducir su solubilidad en el aceite y, en consecuencia, facilitar su remoción con la fase acuosa. En la **Figura 1.4** se muestra un esquema del proceso de desgomado acuoso, tomado de Cabezas (2010).

Las variables operativas del proceso (temperatura, tiempo de contacto y relación de fases acuosa/oleosa) influyen tanto en la cantidad de fosfolípidos removidos del aceite crudo como en la calidad de las lecitinas obtenidas (Pan y col., 2003).

En general se utiliza 1-3% de agua en el aceite crudo, aplicando una agitación vigorosa con tiempos que varían entre 10 y 60 min, dependiendo del proceso empleado.

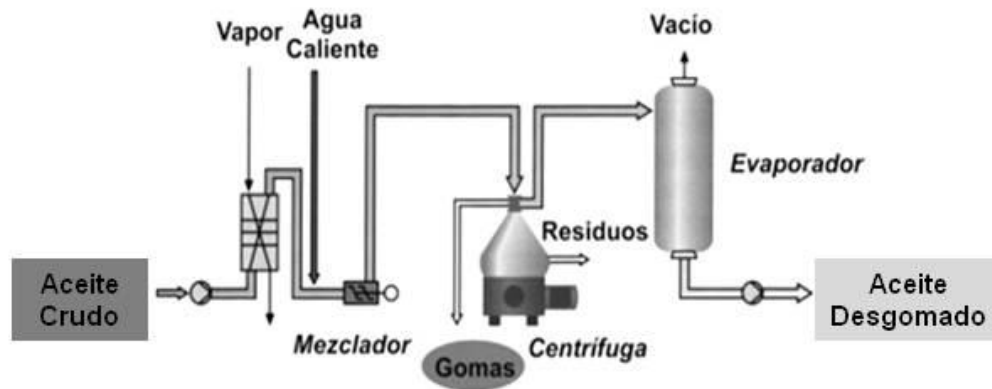


Figura 1.4. Esquema del proceso de desgomado acuoso (Tomado de Cabezas, 2010).

Durante el mismo, la temperatura del aceite debe controlarse entre 60-80°C, ya que las altas temperaturas favorecen la solubilidad de los fosfolípidos y, en cambio, las bajas temperaturas incrementan la viscosidad, dificultando la separación (O'Brien, 1998). La adición de agua posibilita la hidratación de los lípidos polares presentes en el aceite, haciéndolos insolubles. De esta manera, los fosfolípidos hidratados (junto con otros compuestos como glicolípidos, carbohidratos, etc.) forman una goma con una densidad específica mayor que la del aceite, y de esta manera son fácilmente removidos por centrifugación (van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008). Asimismo, también pueden adicionarse pequeñas cantidades (0,1-0,2%) de ácido fosfórico o cítrico para convertir los restantes fosfolípidos no hidratables (sales de Ca y Mg) en fosfolípidos hidratables y así poder extraerlos de la matriz oleosa, mediante centrifugación. Los fosfolípidos fácilmente hidratables son la fosfatidilcolina (PC) y el fosfatidilinositol (PI) y los menos hidratables son el ácido fosfatídico (PA) y la fosfatidiletanolamina (PE); como pudo comprobarse al comparar los perfiles de fosfolípidos de aceites desgomados con el crudo original encontrándose mayores porcentajes de PA y menores de PC en el aceite desgomado (Carelli y col., 1997).

El contenido de fosfoacilglicéridos en el aceite crudo de girasol depende del proceso de extracción utilizado para su obtención. En el aceite obtenido por extracción con solventes el contenido de PLs es mucho mayor que en el aceite extraído por prensado, por lo que según el proceso de extracción utilizado se tendrán distintos rendimientos y variaciones en la composición de las lecitinas obtenidas (Grompone, 2005).

Las gomas obtenidas por centrifugación contienen cerca del 50% de agua, 33% de material insoluble en acetona (lo que equivale a un 20-25% fosfolípidos) y 17% de aceite (Hernandez & Quezada, 2008; van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008).

Hace unos años estas gomas, como subproducto del proceso de extracción de aceites vegetales, eran agregadas a la harina proveniente de la etapa extracción con solvente (**Figura 1.2**). Esto permite aumentar el contenido de materia grasa y favorecer la adhesión del pellet obtenido. Sin embargo, en los últimos años ha comenzado a verse la oportunidad de obtener productos con un mayor valor agregado, adecuados para ser usados como aditivos en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

Debido al alto contenido de agua de las gomas, y a fin de evitar el deterioro microbiológico y minimizar los procesos de oxidación, las gomas deben someterse rápidamente a un proceso de secado a presión reducida y temperaturas inferiores a 80°C (Sinram, 1996; Pan y col., 2003). En este proceso se obtiene la *lecitina cruda*, con un contenido de agua menor al 1,5%, 33% de aceite y 66% de materia insoluble en acetona aproximadamente, lo que representa un 45-50% de fosfolípidos.

Como se verá más adelante, es muy común el uso de tecnologías para la modificación de lecitinas, por ello cabe aclarar que cuando nos referimos a *lecitina nativa* o sólo lecitina, aludimos a la lecitina sin modificar (cruda o desaceitada).

1.4. LECITINAS

Con el nombre de *lecitina* se conoce comúnmente a la mezcla de lípidos polares constituida fundamentalmente por fosfolípidos.

Por su parte, la *Lecithin and Phospholipid Society* (ILPS) ha definido la lecitina como la mezcla de fosfoglicéridos obtenidos de fuentes animales, vegetales o microbiológicas, pudiendo contener una variedad de sustancias como esfingofosfolípidos, triglicéridos, ácidos grasos y glicolípidos (Wendel, 2000).

Sin embargo la definición principal de lecitina dada bajo el código E-322 por la Unión Europea es:

Las lecitinas son mezclas o fracciones de fosfolípidos obtenidas por medio de procedimientos físicos a partir de sustancias alimenticias animales o vegetales; incluyen asimismo los productos hidrolizados obtenidos por utilización de enzimas adecuadas e inocuas. El producto final no debe mostrar actividad enzimática residual.

Las lecitinas pueden ser blanqueadas ligeramente en medio acuoso utilizando peróxido de hidrógeno, pero dicha oxidación no debe afectar químicamente a los fosfolípidos.

1.4.1. COMPOSICIÓN DE LAS LECITINAS

En la **Tabla 1.1** se muestra la composición de lecitinas desaceitadas provenientes de distintas fuentes de origen vegetal y animal (Schneider, 2008).

Tabla 1.1. Composición de lecitinas desaceitadas de diferentes fuentes. (Schneider, 2008)

Fosfolípidos	Composición de Fosfolípidos según su Origen (%)						
	Soja ^a	Canola ^a	Girasol ^a	Maíz ^a	Yema de huevo	Leche	Salmón caviar
Fosfatidilcolina	22	25	25	30	74	27	86
Fosfatidiletanolamina	14	22	11	3	17	30	6
Fosfatidilinositol	12	15	19	16	1	2	2
Fosfoglicerol	2	-	1	1	1	-	1
Ácido fosfatídico	6	-	3	9	-	1	
Esfingomielina	-	-	-	-	3	29	2
Lisofosfolípidos	2	19	-	5	2	-	2
Otros fosfolípidos	7	19	2	4	-	11	-

^aLas lecitinas de origen vegetal contienen también en estas fracciones glicolípidos y carbohidratos, cuyo contenido porcentual completa el 100% de la fracción.

Como puede verse, los fosfolípidos mayoritarios en las lecitinas de origen vegetal son fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y ácido fosfatídico (PA).

En general, la composición de ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos refleja la composición de ácidos grasos del aceite de origen, pero tanto la lecitina de soja como la de girasol presentan un mayor contenido de ácido palmítico y menor de ácido oleico en relación al respectivo aceite, como se ilustra en la **Tabla 1.2** (Carelli y col., 2002a; Dijkstra, 2011a).

Tabla 1.2. Composición de ácidos grasos de lecitinas y aceites de soja y girasol (Adaptado de Dijkstra, 2011a).

Ácido graso	Soja		Girasol	
	Lecitina	Aceite	Lecitina	Aceite
<i>Palmitico (C16:0)</i>	16	11	11	7
<i>Estearico (C18:0)</i>	4	4	4	5
<i>Oleico (C18:1)</i>	17	23	18	29
<i>Linoleico (C18:2)</i>	55	54	63	58
<i>Linolénico (C18:3n3)</i>	7	8	0	0
<i>Otros (C>18)</i>	1	0	4	1

1.4.2. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS FOSFOLÍPIDOS

Las lecitinas son utilizadas como estabilizantes y emulsionantes en numerosos productos alimenticios, tales como panificados, quesos, derivados cárnicos, lácteos, etc. Los niveles de lecitina comúnmente utilizados varían entre 0,2 y 1,0% (Hernandez & Quezada, 2008). Esta funcionalidad está íntimamente ligada con la estructura química de los fosfolípidos.

Los fosfolípidos (PLs) son moléculas constituidas por una parte apolar, diacilo, y otra polar donde se encuentran el grupo fosfato y el sustituyente X (**Figura 1.5**). La naturaleza del acilo y el tipo de sustituyente X determinan la clasificación, propiedades y funciones biológicas del PL. Aquellos PLs que teniendo un solo grupo acilo en la posición *sn*-1 o *sn*-2 del glicerol están en sus correspondientes liso formas (monoacilglicerofosfolípidos) se denominan lisofosfolípidos (ver más adelante **Figura 1.9**).

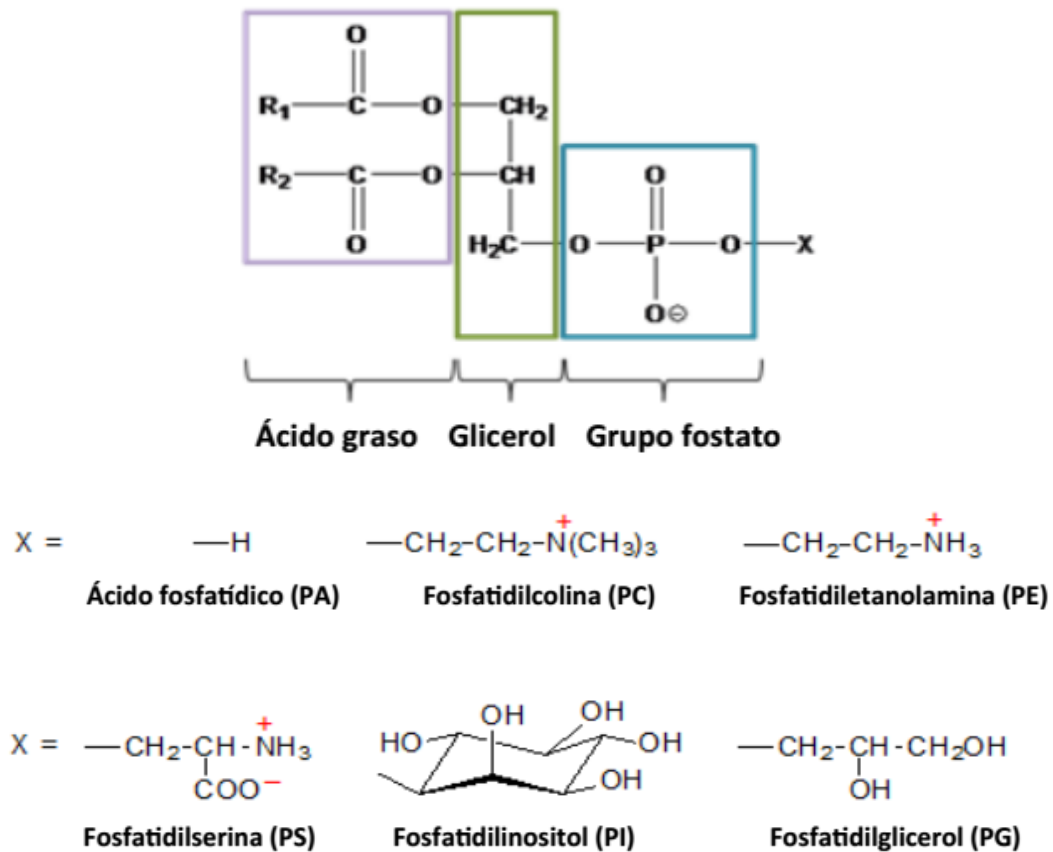


Figura 1.5. Estructura de los fosfolípidos principales presentes en lecitinas de origen vegetal (AOCS Lipid Library).

Esta naturaleza anfifílica de la molécula le otorga propiedades surfactantes o estabilizantes de emulsiones. Los fosfolípidos pueden estabilizar distintos tipos de sistemas con fases inmiscibles, ubicándose en la interfase. Esto crea una disminución de la tensión superficial facilitando el mezclado de las fases y otorgándole estabilidad al sistema. Existen otros mecanismos que permiten a los fosfolípidos actuar como estabilizantes de emulsiones, por ejemplo en emulsiones más complejas con presencia de otros compuestos como proteínas. Este tema se describe con mayor profundidad en el capítulo 2.

La mayoría de los PLs son solubles en cloroformo, diclorometano, hexano, metanol, etanol, isopropanol y piridina. Como se verá más adelante, existen diferencias en el grado de

solubilidad de algunos PLs en etanol, lo que permite el fraccionamiento de las lecitinas para la obtención de productos con composiciones diferentes a la original. Sin bien la lecitina nativa no es soluble en solventes polares, es perfectamente dispersable en sistemas acuosos. La naturaleza anfifílica de los PLs y lisofosfolípidos (LPLs), como resultado de la presencia de grupos alquilo o acilo hidrófobos y grupos hidrófilos polares, les permite formar agregados con el agua, tales como micelas, micelas inversas o vesículas de doble capa. A nivel fisiológico, los PLs son los principales componentes de la membrana celular, y se encuentran presentes en todos los organismos (Iwasaki & Yamane, 2002; Szuhaj, 2005; Carlsson, 2008).

Las lecitinas/fosfolípidos se "dispersan" en el agua con la formación de un número de mesofases altamente ordenadas de cristal líquido. La formación y la estructura de estas fases están relacionadas con la concentración, la temperatura y también son inducidas por los cambios de pH. Los fosfolípidos en soluciones acuosas tienden a maximizar la hidratación de los grupos polares y a minimizar el contacto con el agua de las cadenas hidrocarbonadas. Esta capacidad espontánea del sistema para evolucionar desde un estado desordenado a estructuras definidas y ordenadas, responde a la necesidad de disminuir la función G (energía libre de Gibbs) para el sistema planteado y resulta de gran importancia durante el proceso de desgomado y en la formulación de emulsiones. En la **Figura 1.6** pueden observarse las distintas formas y distribución espacial de sustancias anfipáticas como los fosfolípidos cuando se encuentran en un medio líquido. El tamaño del grupo polar influye en la distribución y empaquetamiento de las moléculas (Whitehurst, 2004; Penci, 2009; Guiotto, 2014).

Tal como se ha descrito, la estructura de los fosfolípidos determinará el tipo de agregado que formarán en la interfase. Por lo tanto, la modificación de la molécula, ya sea en sus grupos polares o en la zona no polar, podría provocar un cambio en la organización de los fosfolípidos. El PI, al igual que la PC, forma estructuras lamelares muy ordenadas (**Figura 1.6**, cono truncado y/o cilindro), favorecidas por la escasa repulsión de sus grupos polares. Particularmente, la PC forma estructuras muy útiles en la fabricación de liposomas. La PE, PS y ocasionalmente PA (dependiendo del pH del medio) son fosfolípidos con una alta repulsión en sus grupos polares, forman estructuras H_{II} (Hexagonal invertida) (**Figura 1.6**, cono truncado invertido) y presentan sensibilidad a los cambios de pH y a la presencia de metales mono y divalentes (Carlsson, 2008; van Nieuwenhuyzen, 2014).

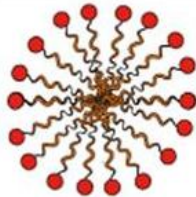

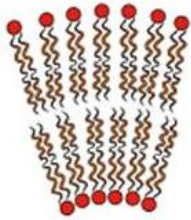



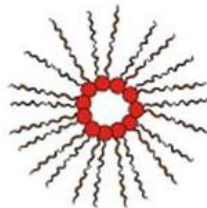
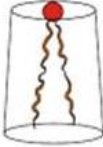
Organización	Forma	Estructura y Fases
	 Cono	Moléculas anfipáticas de cadena simple con un grupo polar grande. Fase: Micela hexagonal H_I
	 Cono truncado	Moléculas anfipáticas de cadena simple con un grupo polar pequeño o de doble cadena con un grupo polar grande. Fase: Laminar flexible
	 Cilindro	Moléculas anfipáticas de doble cadena con un grupo polar pequeño. Fase: Laminar cúbica
	 Cono truncado invertido	Moléculas anfipáticas de doble cadena con un grupo polar pequeño, o anfipáticas no iónicas con cadenas poliinsaturadas. Fase: Micelas inversas hexagonal H_{II}

Figura 1.6. Estructura y comportamiento de moléculas anfipáticas (Tomado de Penci, 2009).

En la **Figura 1.7** se muestran ejemplos de las distintas conformaciones que adoptan la PC y LPC en una emulsión de aceite en agua (o/w) y la PE en una emulsión de agua en aceite (w/o).

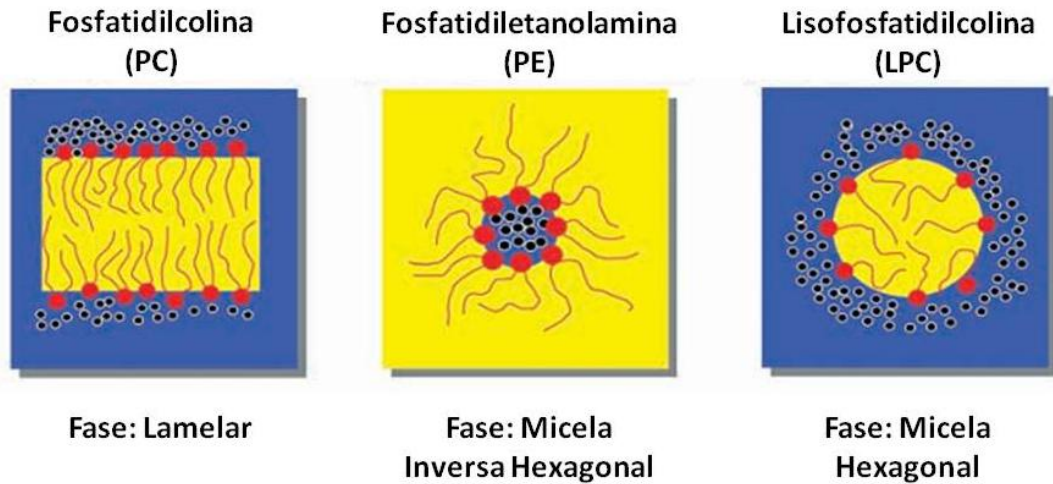


Figura 1.7. Ejemplo del comportamiento de fosfolípidos (PC y PE) y lisofosfolípidos (LPC) en la interfase de una emulsión (Tomado de van Nieuwenhuyzen, 2014).

Por su parte, se considera que los lisofosfolípidos adoptan una forma de cono (o cono invertido, según el medio), es decir que no son formadores de bicapa. (Nguyen et al., 2014).

Las propiedades emulsionantes de las lecitinas a menudo se caracterizan mediante su valor de balance hidrofílico-hidrofóbico (HLB). Este valor varía entre 1 y 20, en donde 1 corresponde a un surfactante soluble en aceite y 20 a un emulsionante completamente soluble en agua. Lecitinas típicas con 62% de insolubles en acetona tienen un valor HLB de aproximadamente 4. Las lecitinas desaceitadas tienen valores de alrededor de 7, y las lecitinas modificadas químicamente (por ejemplo, hidroxiladas) muestran valores superiores a 10 (Szuhaj, 2005).

1.4.3. CARACTERIZACIÓN DE LECITINAS

Las especificaciones que deben cumplir las lecitinas para ser consideradas de grado alimentario se encuentran reguladas por el Codex Alimentarius de la FAO/OMS, la Unión Europea bajo el código E322 y el Food Chemical Codex de la FDA, estando enmarcada en la lista de sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS), sin limitación en lo que respecta a la ingesta diaria admisible (Cabezas, 2010).

Varios métodos son utilizados habitualmente para la determinación de las especificaciones durante la producción, control de calidad y la comercialización de lecitinas. A continuación se describen brevemente algunas de las determinaciones asociadas a su calidad:

Materia Insoluble en Acetona (MIA):

La cantidad de materia insoluble en acetona (MIA %) brinda información sobre la cantidad aproximada de fosfolípidos, glicolípidos e hidratos de carbono, ya que el aceite y los ácidos grasos se disuelven en acetona.

Valor Ácido:

El valor ácido (VA) expresa la acidez titulable en la lecitina en mg KOH/g de muestra, y representa la acidez dada a la mezcla por los PLs y AGLs. Normalmente el contenido de AGLs del aceite crudo es bajo, por lo que un alto VA en lecitinas líquidas es en general originado por el agregado de AGLs destilados para modificar la viscosidad del producto. Para determinar la acidez otorgada sólo por los AGLs, el método correcto es titular sólo la porción soluble en acetona, eliminando cualquier contribución de los PLs al VA (Braverman, 1999; van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008).

Insolubles en Hexano (IH):

La materia insoluble en hexano (MIH) es una medida de la pureza de la lecitina. Por lo general está formada de fibra residual, pero a veces partículas contaminantes pueden introducirse durante el proceso (ej. auxiliares de filtración). El nivel de MIH en la lecitina cruda no debe exceder el 0,3% y rara vez supera el 0,1%. La MIH de lecitina es perjudicial para la claridad y la facilidad de uso en algunas aplicaciones específicas (Braverman, 1999).

Contenido de Agua (Humedad):

Debido a que las lecitinas están compuestas por sustancias hidratables siempre contienen algo de agua. El contenido de humedad (H%) en la lecitina cruda en general es alrededor del 1% (m/m), y como máximo puede contener un 2%, para evitar contaminación microbiana (Whitehurst, 2004).

Otros:

Además la calidad de las lecitinas es determinada mediante otros parámetros como la viscosidad, el color, el perfil de fosfolípidos y/o ácidos grasos, el contenido de metales pesados, pesticidas y/o residuos de solventes, calidad microbiológica, etc. (Whitehurst, 2004; van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008).

1.5. PROCESOS DE MODIFICACIÓN DE LECITINAS

Las propiedades químicas y físicas de los PLs dependen de sus estructuras moleculares. Dicha estructura puede modificarse por vía física, química y enzimática con el propósito de obtener un producto con propiedades fisiológicas y tecnológicas que no posee el PL original.

(Baeza Jiménez, 2013). Las modificaciones más ampliamente empleadas son (i) la modificación de las moléculas de fosfolípidos por vía enzimática o química, (ii) la separación física del aceite en lecitinas crudas (desaceitado), y (iii) el fraccionamiento de las diferentes clases de fosfolípidos. A continuación se describen las tecnologías más utilizadas en la modificación de lecitinas.

1.5.1. MODIFICACIÓN QUÍMICA

Los métodos químicos empleados para la síntesis y modificación de los PLs incluyen la hidrólisis para producir lisofosfolípidos, la hidrogenación e hidroxilación de dobles enlaces en la cadena de ácidos grasos y la acetilación del grupo amino en PE (Guo, Vikbjerg, & Xu, 2005). Los objetivos principales de la modificación química consisten en proveer a los compuestos de una estructura química definida para una evaluación precisa de los procesos bioquímicos y de la actividad específica de las enzimas, preparar análogos de bioactivos naturales para el desarrollo de medicamentos novedosos y el desarrollo de procesos de bajo costo y de fácil escalado para productos potencialmente aplicables. Químicamente se han obtenido PLs de productos naturales y semisintéticos.

La hidroxilación de los AGs insaturados de los PLs se lleva a cabo con peróxidos y ácidos orgánicos, y las lecitinas obtenidas son más hidrofílicas.

La acetilación consiste en la modificación del grupo amino de la PE, que reacciona con anhídrido acético obteniéndose PE-acetilada, mejorando las propiedades emulsionantes o/w de la lecitina.

1.5.2. MODIFICACIÓN POR FRACCIONAMIENTO

1.5.2.1. REMOCIÓN DE ACEITE RESIDUAL (DEOILING)

El aceite residual de la lecitina cruda puede separarse para obtener *lecitinas desaceitadas* o *de-oiled*. Los métodos más comúnmente utilizados son: separación con acetona, extracción supercrítica con CO₂, extracción cuasi-crítica con propano, y tecnologías de membrana. Mayor detalle sobre estas tecnologías puede consultarse en van Nieuwenhuyzen & Tomás (2008).

1.5.2.2. FRACCIONAMIENTO DE FOSFOLÍPIDOS

Los PLs presentan diferencias entre sí en la solubilidad en distintos solventes. Esta propiedad es utilizada para la obtención de fracciones con características diferenciadas. El uso de etanol absoluto y/o soluciones etanólicas para el fraccionamiento es el método más utilizado, ya sea en forma individual o en conjunto con una etapa de separación cromatográfica para aumentar la pureza (van Nieuwenhuyzen, 1999; van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008).

La PC se disuelve en etanol o soluciones etanólicas con mayor facilidad que los otros fosfolípidos mayoritarios. Esta característica permite fraccionar las lecitinas nativas en fracciones solubles (enriquecidas en PC) e insolubles (enriquecidas en PI) en etanol (Cabezas y col., 2009). Ambas fracciones son de gran interés en la industria alimentaria debido a sus propiedades tecnológicas. La fracción soluble mejora la capacidad de emulsificación en emulsiones aceite en agua (o/w), mientras que la fracción insoluble se utiliza en emulsiones de agua en aceite (w/o). El proceso de fraccionamiento con etanol se puede utilizar para

modificar la composición de lecitinas nativas y modificadas. Las fracciones de PC de alta pureza (98%) son producidas casi exclusivamente para su aplicación en la industria farmacéutica; su alto costo de obtención hace que su uso como emulsificante a gran escala sea prohibitivo para la industria alimentaria. No obstante, estas fracciones son utilizadas para la formación de liposomas en el encapsulamiento de componentes de alto valor en los alimentos como antioxidantes o componentes del flavor (van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008).

1.5.3. MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA

Las lecitinas modificadas por hidrólisis enzimática presentan ventajas tecnológicas y comerciales con respecto a las lecitinas nativas, gracias a su gran capacidad como emulsionantes o/w. Las variables operativas que afectan la actividad de las lipasas o fosfolipasas, y por lo tanto el proceso de hidrólisis, son numerosas. Entre ellas se encuentra el pH, la temperatura, la presencia de cofactores, sales y solventes orgánicos (Guo y col., 2005; van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008; Pencj, 2009).

En las reacciones de hidrólisis una molécula de agua realiza el ataque nucleofílico y la reacción hidrolítica es promovida por la enzima correspondiente.

Las *lipasas* son enzimas ampliamente utilizadas para la obtención de lípidos modificados, con importantes aplicaciones en la industria de alimentos. En términos generales, la estructura de las lipasas contiene un elemento móvil denominado *lid*, constituido por dos cadenas de aminoácidos (α -hélices) que funciona como una especie de tapa en el sitio activo de la enzima. Cuando estas cadenas se encuentran hacia afuera, permiten la unión del sustrato con la enzima y así ésta puede catalizar la reacción (Gutiérrez y col., 2007; Pencj, 2009).

Las *fosfolipasas*, son un grupo de enzimas que actúan en diferentes sitios dentro de la estructura de los fosfolípidos, y según esto se clasifican en A₁, A₂, B, C, y D (**Figura 1.8**).

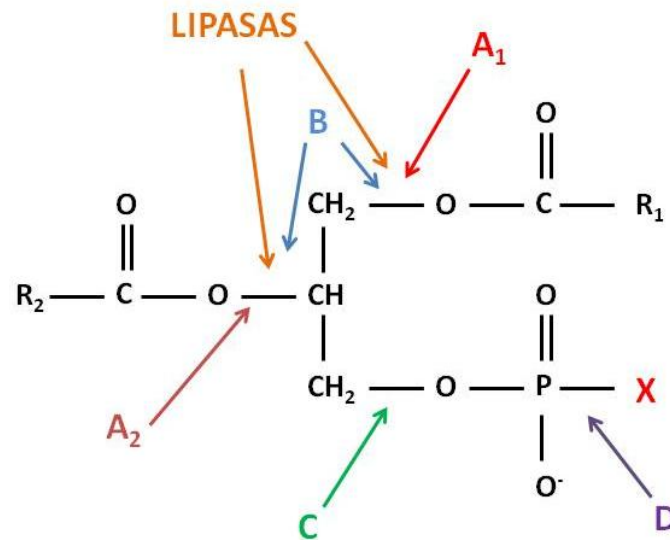


Figura 1.8. Distintos tipos de lipasas y fosfolipasas utilizados para la modificación enzimática de lecitinas, según su especificidad.

Tanto las lipasas como las fosfolipasas A₁, A₂ (PLA₁ y PLA₂) y B hidrolizan los fosfolípidos en la posición *sn*-1 (lipasas, PLA₁ y PLB) y *sn*-2 (PLA₂ y PLB) produciendo lisofosfolípidos y ácidos grasos libres (AGLs). En la **Figura 1.9** se muestra la nomenclatura de los PLs y LPLs según la posición de los AG (R₁ y R₂).

Por otra parte, la fosfolipasa C ataca el enlace entre el glicerol y el grupo fosfato, obteniéndose diglicéridos (DGs), y la fosfolipasa D, ataca el enlace entre el grupo fosfato y el sustituyente, obteniéndose ácido fosfatídico (PA).

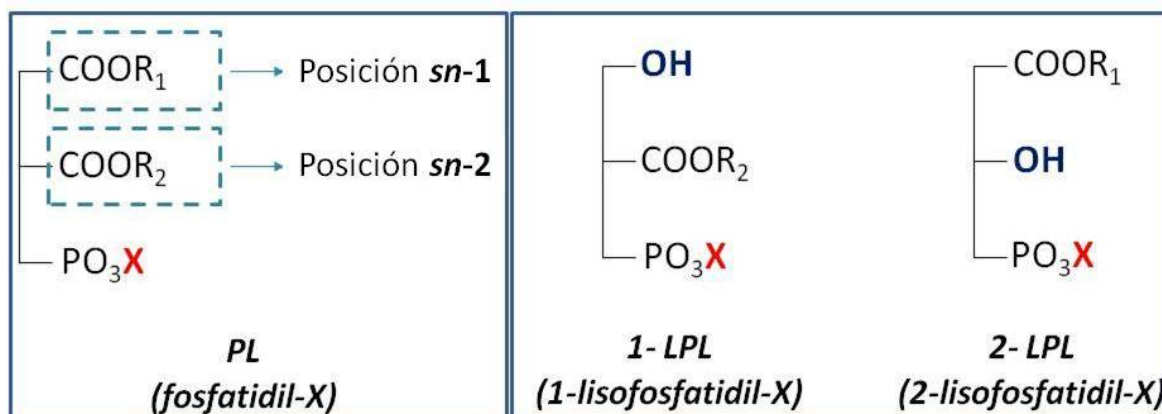


Figura 1.9. Esquema de moléculas de fosfolípidos (PL) y lisofosfolípidos (LPL) y ejemplos de su nomenclatura según la posición del ácido graso.

Los lisofosfolípidos, al perder un AG en la molécula, poseen un carácter hidrofílico mucho mayor que los PLs. Por ello las lecitinas hidrolizadas con alto contenido de LPLs (*lisolecitinas*) tienen propiedades emulsionantes mejoradas actuando en sistemas o/w. (Iwasaki & Yamane, 2002)

El tipo de enzima más comúnmente utilizado para la obtención de lisofosfolípidos es la PLA₂. Sin embargo, con el advenimiento de la disponibilidad comercial de PLA₁, varios autores comenzaron a estudiar la modificación de aceites vegetales y lecitinas de diferente origen utilizando este tipo de enzimas (Vijeeta y col., 2004; Penci y col., 2010; Estiasih y col., 2013).

Para el desarrollo de esta tesis se ha seleccionado la enzima Lecitase® Ultra para la hidrólisis enzimática de lecitina cruda de girasol. Esta enzima se encuentra dentro de la categoría de fosfolipasas con actividad A₁ (PLA₁), y presenta la ventaja de ser una enzima proveniente de microorganismos, lo que facilita su producción a escala industrial, y los productos obtenidos entrarían dentro de la clasificación kosher, en contraste con la ya mencionada PLA₂, que se obtiene de glándulas de porcinos (Penci, 2009). Además, al hidrolizar la posición sn-1 del PL,

donde en general se encuentran en mayor proporción AGs saturados, los LPLs resultantes de la hidrólisis con PLA₁ podrían presentar mayor contenido de AGs insaturados, lo que le podría conferir mayor carácter hidrofílico (Estiasih y col., 2013).

La nomenclatura para la PLA₁ según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) es 3.1.1.32 (Aloulou y col., 2012).

Es importante destacar que el uso de enzimas como alternativa a los procesos químicos para la obtención de productos con propiedades características en la industria, brinda una alternativa limpia y amigable con el ambiente. En los últimos años, ha crecido considerablemente la demanda de procesos no contaminantes, que consuman menos energía, y disminuyan los costos: en este contexto, la tecnología enzimática aparece como una muy buena alternativa (Aloulou y col., 2012).

1.6. APLICACIONES DE LAS LECITINAS Y PERSPECTIVAS

En la industria de alimentos las lecitinas son unos de los emulsionantes más ampliamente empleados. Existen numerosas aplicaciones de los productos de lecitina en la industria alimentaria, siendo hoy en día uno de los aditivos más utilizados y versátiles. Como grupo, pueden usarse para estabilizar tanto emulsiones w/o como o/w. Sin embargo, a pesar de que son aplicadas en un amplio rango de aplicaciones, aún es difícil encontrar datos sistemáticos acerca de las propiedades emulsionantes y su correlación con las aplicaciones. Por ello es muy importante conocer la composición de los distintos tipos de lecitinas

utilizadas en las diferentes aplicaciones y lograr correlacionar la composición con sus propiedades surfactante (Nguyen y col., 2014).

En el mercado las lecitinas están disponibles en forma fluida y sólida dependiendo de su contenido de aceite, y en forma de polvos (lecitinas desaceitadas). También se encuentran disponibles distintas lecitinas modificadas en su contenido de fosfolípidos, como fracciones enriquecidas en PC o PI.

Las lecitinas nativas y modificadas se utilizan en un amplio rango de aplicaciones industriales: nutricionales, alimenticias, farmacéuticas, cosméticas, etc. (Braverman, 1999; Wendel, 2000). En la industria alimentaria, las lecitinas representan un aditivo multifuncional en la elaboración de chocolate, panificados, productos instantáneos, margarinas y mayonesas, entre otros. En particular, las lecitinas hidrolizadas enzimáticamente pueden presentar ventajas tecnológicas y comerciales con respecto a las lecitinas nativas: (1) mejores propiedades emulsionantes o/w; (2) mayor estabilidad de la emulsión en condiciones ácidas y en presencia de sales; (3) capacidad mejorada de ligar proteínas y almidones; (4) excelentes propiedades desmoldantes (Cabezas y col., 2012).

En consecuencia de ello, la demanda de lisolecitinas se ha incrementado en años recientes, y el mercado de las lecitinas en general (nativas y modificadas) se encuentra en constante expansión y evolución, surgiendo nuevas aplicaciones y desafíos tecnológicos para los productores (van Nieuwenhuyzen, 2014).

En los últimos años, ciertas tendencias por parte de los consumidores de la Unión Europea (UE) reflejadas en requerimientos comerciales, han llevado a un cambio importante en las importaciones de lecitina de ese grupo de países. Argentina se encuentra dentro de los países más importantes en este cambio, aumentando significativamente sus exportaciones

de lecitina a la UE en los últimos 10-12 años. Según van Nieuwenhuyzen (2014), estos cambios se deben a un incremento en la disponibilidad de productos provenientes de lo que se denomina organismos de identidad protegida (es decir, que no fueron modificados genéticamente), tales como la soja no transgénica en Brasil e India, y el girasol en Argentina. Esto puede observarse en la **Figura 1.10**, donde se muestran las importaciones de lecitina recibidas por la UE desde el año 2002, según el país de origen.

A nivel mundial, la mayor parte de la soja sembrada proviene de semillas modificadas genéticamente (GMO, del inglés Genetically Modified Organism). La expansión de las semillas de soja GMO fue muy rápida debido a su alta resistencia a herbicidas. El uso de GMOs en ingredientes o aditivos alimenticios resulta de gran preocupación por parte de los consumidores, especialmente en Europa, el mayor importador de lecitinas de nuestro país.

Como resultado de ello, se ha abierto una oportunidad en el mercado para productos que no provengan de organismos genéticamente modificados (no-GMO), entre los que se encuentran las lecitinas de girasol (WHO, 2013).

A pesar de que el contenido de fosfolípidos en el girasol es menor que en la soja, la lecitina de girasol se ha vuelto muy popular en la última década, no sólo por el interés de no consumir GMOs sino también por las posibles reacciones alérgicas que pueden causar los productos derivados de la soja (Nguyen et al., 2014). Reemplazar la lecitina de soja por lecitina de girasol, permite a las industrias manufactureras de alimentos evitar rotular sus productos como alergénicos por su contenido de soja, si no contienen otros componentes alergénicos.

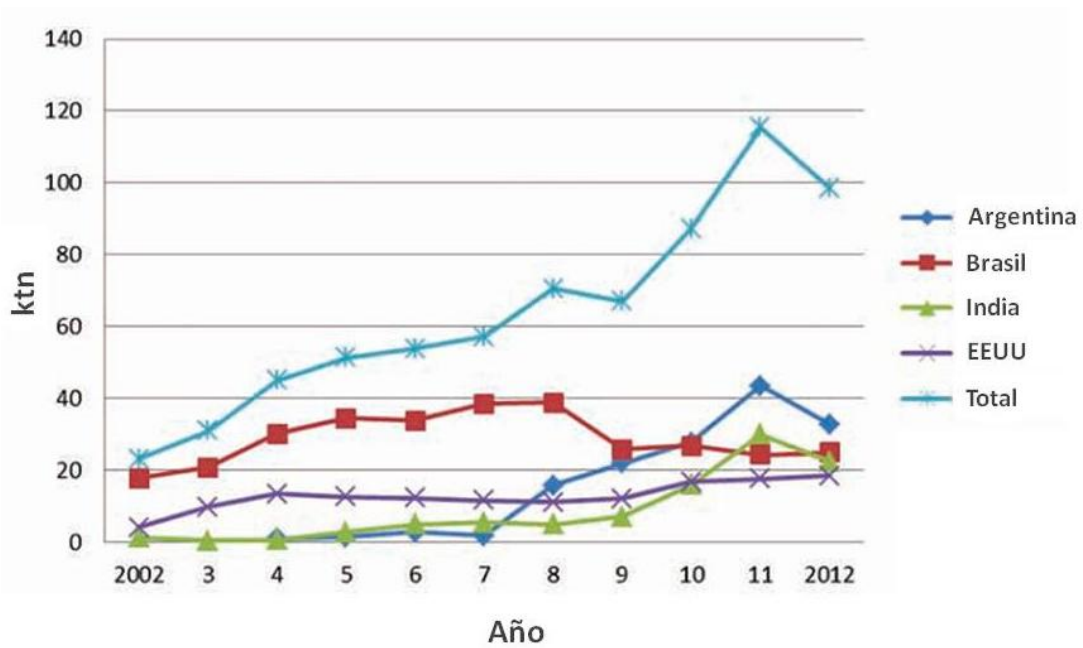


Figura 1.10. Importaciones de lecitina de la Unión Europea provenientes de los países exportadores más importantes, en el período 2002-2012 (Tomado de van Nieuwenhuyzen, 2014).

Según lo reportado por van Nieuwenhuyzen (2014), a pesar de que el mercado de lecitina ha estado creciendo de manera constante, hoy en día se estima que sólo el 15–20% de las gomas son procesadas para obtener lecitinas con estándares de calidad que permitan su utilización como compuestos funcionales de gran valor en la industria farmacéutica y de alimentos. Por ello es de gran utilidad aportar conocimientos para la implementación de procesos que aporten valor a estos subproductos del proceso de refinación de aceites vegetales.

1.7. OBJETIVOS DE LA TESIS

OBJETIVO GENERAL:

El objetivo general de esta tesis es aportar conocimientos para el aprovechamiento de la goma proveniente del desgomado acuoso en la elaboración de aceites vegetales, mediante la obtención de un derivado oleaginoso de mayor valor agregado utilizando una tecnología “limpia” como es la enzimática.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Para lograr este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar a escala de laboratorio la modificación por hidrólisis enzimática de lecitinas crudas de origen vegetal, en particular las obtenidas a partir de aceite de girasol, utilizando una enzima con actividad fosfolipasa (PLA₁), analizando la influencia de distintas variables operativas sobre la cinética de reacción y la eficiencia del proceso según los productos obtenidos, determinando las condiciones óptimas o recomendables.
2. Caracterizar cualitativa y cuantitativamente la materia prima y las lecitinas modificadas mediante hidrólisis, implementando o desarrollando las técnicas analíticas necesarias.

- 3.** Evaluar los efectos de la modificación enzimática de la lecitina en su calidad como emulsionante/ estabilizante. Para ello se estudiará el comportamiento de emulsiones complejas que simulen una emulsión alimenticia real, con el agregado de las lecitinas crudas y modificadas.

- 4.** Establecer el efecto de la composición de los productos obtenidos según el grado de hidrólisis de la lecitina en las propiedades de las emulsiones estudiadas.

1.8. BIBLIOGRAFÍA

- Aloulou, A., Ali, Y. Ben, Bezzine, S., Gargouri, Y., & Gelb, M. H. (2012).** Capítulo 4: Phospholipases: An Overview. En *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols* (Vol. 861, pp. 63–85). Humana Press, New York.
- AOCS Lipid Library. (2014).** A Lipid Primer - Complex Glycerolipids <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/complex.html>. (acceso Julio 2014)
- ASAGA. (2014).** Producción Mundial de Girasol 2014/2015. @asaganews. <http://www.asaga.org.ar/index.php/es/noticias/internacionales/16-noticias/internacionales/605-producción-mundial-de-girasol-2014-2015.html> (acceso Agosto de 2014).
- Baeza Jiménez, R. (2013).** *Desarrollo de Procesos Enzimáticos Selectivos para Aplicaciones Nutricionales*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Braverman, V. (1999).** Productos comerciales de lecitina. *Aceites Y Grasas, Marzo*, 111–116.
- Brevedan, M. I. V., Carelli, A. A., & Crapiste, G. H. (2000).** Changes in composition and quality of sunflower oil during extraction and degumming. *Grasas Y Aceites*, 51(6), 417–423.
- Cabezas, D. M. (2010).** *Modificaciones Tecnológicas de Lecitinas de Girasol. Aplicaciones en el Área Alimentaria*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Cabezas, D. M., Diehl, B. W. K., & Tomás, M. C. (2009).** Sunflower lecithin: Application of a fractionation process with absolute ethanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86, 189–196.
- Cabezas, D. M., Madoery, R., Diehl, B. W. K., & Tomás, M. C. (2012).** Capítulo 3: Emulsifying Properties of Hydrolyzed Sunflower Lecithins by Phospholipases A₂ of Different Sources. En *Food Industrial Processes – Methods and Equipment* (pp. 39–50). In Tech, Rijeka.
- Carelli, A. A., Brevedan, M. I. V., & Crapiste, G. H. (1997).** Quantitative determination of phospholipids in sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(5), 511–514.

- Carelli, A. A., Ceci, L. N., & Crapiste, G. H. (2002a).** Phosphorus-to-phospholipid conversion factors for crude and degummed sunflower oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(12), 1177–1180.
- Carelli, A. A., Frizzera, L. M., Forbito, P. R., & Crapiste, G. H. (2002b).** Wax composition of sunflower seed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(8), 763–768.
- Carlsson, A. (2008).** Capítulo 5: Physical properties of phospholipids. En *Phospholipid Technology and Applications* (pp. 95–137). Woodhead Publishing, Cambridge.
- Carrín, M. E., & Carelli, A. A. (2010).** Capítulo 2: Changes in Quality and Composition of Sunflower Oil During Processing and Storage. En *Advances in Fats and Oil Research* (Vol. 661, pp. 25–48). Transworld Research Network, Kerala.
- Dijkstra, A. J. (2011a).** Edible Oil Processing – Refining. Deguming. *The AOCS Lipids Library*. <http://lipidlibrary.aocs.org/processing/degum-intro/index.htm> (acceso Julio 2014)
- Dijkstra, A. J. (2011b).** Un Nuevo análisis del proceso de desgomado de aceites vegetales. *Aceites Y Grasas*, 82, 120–123.
- Dijkstra, A. J., & van Opstal, M. (1989).** The total degumming process. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66, 1002–1009.
- Dudrow, F. A. (1983).** Deodorization of edible oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60, 272–274.
- Erdelyi, A. P. (1988).** Enzymic Modification of Sunflower Lecithin. En *Proceedings of the 8th International Symposium on the Biological Role of Plant Lipids. Capítulo 6: Biotechnology of Lipids, Nutritional Aspects* (pp. 461–464). Plenum Press, Budapest.
- Estiasih, T., Ahmadi, K., Ginting, E., & Priyanto, A. D. (2013).** Modification of soy crude lecithin by partial enzymatic hydrolysis using phospholipase A₁. *International Food Research Journal*, 20(2), 843–849.
- Franco, D. (2014).** Informe Sectorial de Oleaginosas N°11. *Área de Sectores Alimentarios - Dirección de Agroalimentos - Subsecretaría de Agregado de Valor y Nuevas Tecnologías*. http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/aceites/Informes/Oleaginosas_anuario_2013.pdf (acceso Julio 2014)

- Givon, V., & Tirtiaux, A. (2000).** Revisión de los distintos métodos para la eliminación de gomas y ceras. *Aceites Y Grasas, Septiembre*, 381–391.
- Grompone, M. A. (2005).** Capítulo 14: Sunflower Oil. En *Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Vol 2. Edible Oil and Fat Products: Edible Oils* (6° ed., pp. 655–730). John Wiley & Sons, Inc, Hoboken.
- Guiotto, E. N. (2014).** *Aplicación de Subproductos de Chía (Salvia hispanica L.) y Girasol (Helianthus annuus L.) en Alimentos*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Guo, Z., Vikbjerg, A. F., & Xu, X. (2005).** Enzymatic modification of phospholipids for functional applications and human nutrition. *Biotechnology Advances*, 23, 203–259.
- Gutiérrez, C., Carelli, A. A., & Ferreira, L. (2007).** Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 35–43.
- Hernandez, E., & Quezada, N. (2008).** Capítulo 4: Uses of Phospholipids as Functional Ingredients. En *Phospholipid technology and applications* (pp. 83–92). The Oily Press, Cambridge.
- Iwasaki, Y., & Yamane, T. (2002).** Phospholipases in Enzyme Engineering of Phospholipids for Food, Cosmetics and Medical Applications. En *Lipid Biotechnology*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Melgarejo, M. (2003).** *Tendencias de las Nuevas Tecnologías. Industria Oleaginosa con Enfoque Específico en Girasol y Soja (Reporte B-9-Secretaría de Política Económica, Ministerio de Economía de la Nación)* (pp. 1–21). <http://www.cepal.org/argentina/noticias/paginas/7/12267/Informe337B9.pdf> (acceso Agosto 2014)
- Nguyen, M. T., Van de Walle, D., Petit, C., Beheydt, B., Depypere, F., & Dewettinck, K. (2014).** Mapping the chemical variability of vegetable lecithins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(7), 1093–1101.
- O'Brien, R. (1998).** *Fats and Oils. Formulating and Processing for Applications*. Technomic Publishing Co, Inc., Pennsylvania.

- Pan, L. G., Buedo, A., Tomás, M. C., Añon, M. C., & Calvelo, A. (2003).** Obtención, Acondicionamiento y Caracterización de Lecitinas de Girasol. En *2do. Congreso Argentino de Girasol*. ASAGIR, Buenos Aires.
- Penci, M. C. (2009).** *Modificación Enzimática de Lecitinas*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur, Argentina.
- Penci, M. C., Constenla, D. T., & Carelli, A. A. (2010).** Free-fatty acid profile obtained by enzymatic solvent-free hydrolysis of sunflower and soybean lecithins. *Food Chemistry*, *120*(1), 332–338.
- Sánchez-Muniz, F. J., & Cuesta, C. (2003).** Sunflower Oil. En *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (p. 5672). Elsevier Science Ltd., Amsterdam.
- Schneider, M. (2008).** Capítulo 2: Major Sources, Composition and Processing. En *Phospholipid technology and applications* (pp. 21 – 39). Woodhead Publishing, Cambridge.
- Sinram, R. D. (1996).** El valor agregado en lecitinas para uso en especialidades. *Aceites Y Grasas, Marzo*, 105-110.
- Stepycheva, N. V., Makarov, S. V., & Kucherenko, P. N. (2012).** Secondary material resources of oil-producing plants. *Russian Journal of General Chemistry*, *82*(5), 969–976.
- Szuhaj, B. F. (2005).** Capítulo 13: Lecithins. En *Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Vol 3. Edible Oil and Fat Products: Specialty Oils and Oil Products* (6° ed., pp. 361–456). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- Van Nieuwenhuyzen, W. (1999).** Fractionation of lecithin. *European Food & Drink Review*, *27*, 10–32.
- Van Nieuwenhuyzen, W. (2014).** The changing world of lecithins. *International News on Fats, Oils, and Related Materials (INFORM)*, *25*(4), 193–272.
- Van Nieuwenhuyzen, W., & Tomás, M. C. (2008).** Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *110*(5), 472–486.

- Vijeeta, T., Reddy, J. R. C., Rao, B. V. S. K., Karuna, M. S. L., & Prasad, R. B. N. (2004).** Phospholipase-mediated preparation of 1-ricinoleoyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine from soya and egg phosphatidylcholine. *Biotechnology Letters*, 26(13), 1077–1080.
- Wendel, A. (2000).** Lecithin. En *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Whitehurst, R. J. (2004).** *Emulsifiers in Food Technology*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford.
- WHO. (2013).** Genetically Modified Foods. <http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/20questions/en/> (acceso Agosto 2014)

CAPÍTULO II:
EMULSIONES:
PROPIEDADES Y FUNDAMENTOS

2. EMULSIONES: PROPIEDADES Y FUNDAMENTOS

En este capítulo se describen los conceptos teóricos y generales de las emulsiones, intentando dar al lector una breve introducción en el tema.

2.1. INTRODUCCIÓN

Una emulsión es una dispersión compuesta por la mezcla de al menos dos fases inmiscibles. Una de las fases se encuentra en forma de gotas (*fase dispersa*) dentro de la otra (*fase continua*). Desde el punto de vista termodinámico es considerado un sistema metaestable, por lo tanto, las influencias químicas, físicas y microbiológicas a las que esté expuesta durante su manufactura, transporte y almacenamiento, pueden producir fácilmente su desestabilización originando cambios visibles en la emulsión. Estos cambios pueden ser provocados por temperatura, exposición al calor, presión externa, etc. (Brummer, 2006).

Las emulsiones alimenticias tienen su origen en la naturaleza y han ido evolucionando junto con los avances en las técnicas de procesamiento de alimentos. El desarrollo de los

emulsionantes sintéticos, que comenzaron a ser ampliamente usados recién en la segunda mitad del siglo XX, fue impulsado por la industria de los alimentos procesados, que requería productos estables para ser distribuidos a través de los canales de consumo masivo (Hasenhuettl, 2008; Schneider, 2008).

En la mayoría de las emulsiones alimenticias los diámetros de gota varían entre 0,1-100 μm , y generalmente sus componentes inmiscibles son agua y aceite.

Las emulsiones pueden ser clasificadas de acuerdo con la distribución de las fases oleosa y acuosa. Un sistema en el que hay gotas de aceite dispersas en una fase acuosa se denomina emulsión aceite en agua o emulsión **o/w** (oil in water). Ejemplos de este tipo de sistema en alimentos son las mayonesas, la leche, cremas, salsas, etc. (**Figura 2.1 A**). Un sistema que consiste en gotas de agua dispersas en una fase oleosa se conoce como emulsión agua en aceite o emulsión **w/o** (water in oil), como por ejemplo, la margarina o la manteca (**Figura 2.1 B**). Además, existen emulsiones múltiples, llamadas así por contener en la fase dispersa una emulsión (**o/w/o** o **w/o/w**).

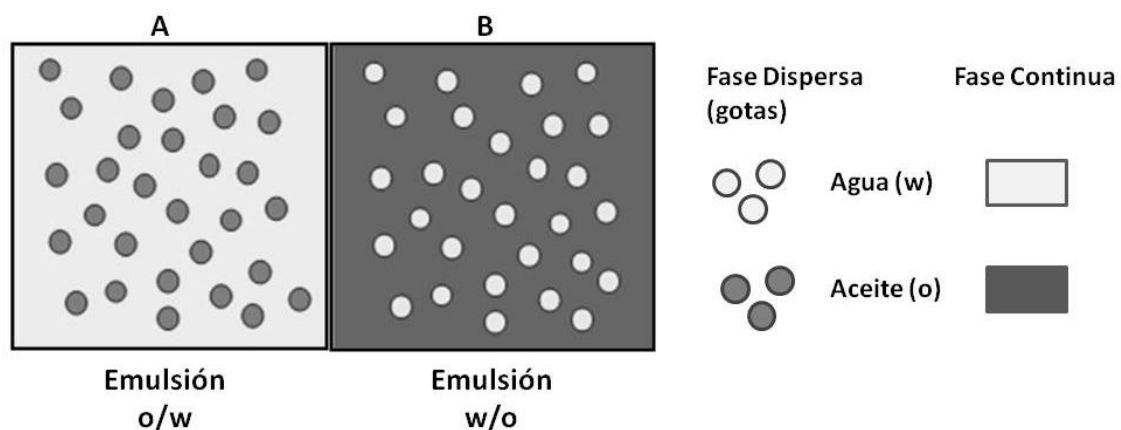


Figura 2.1. Representación esquemática de diferentes tipos de emulsiones según sus fases dispersa y continua. A: emulsión aceite en agua (o/w) y B: emulsión agua en aceite (w/o).

Los emulsionantes modernos son en su mayoría aditivos con propiedades *surfactantes* que reducen la tensión superficial de la fase dispersa de la emulsión. Este tipo de compuestos se dice que presentan *actividad superficial*. Estos incluyen a los agentes espumantes, antiespumantes, humectantes, detergentes y solubilizantes. Puede lograrse una gran variedad de estructuras de emulsiones dependiendo del emulsionante utilizado, su combinación con otros estabilizantes y su concentración en el producto (Brummer, 2006).

En la **Figura 2.2** se muestra un esquema de los surfactantes más utilizados en emulsiones alimenticias (proteínas, lecitinas y monoglicéridos), estabilizando una gota de aceite en una emulsión o/w.

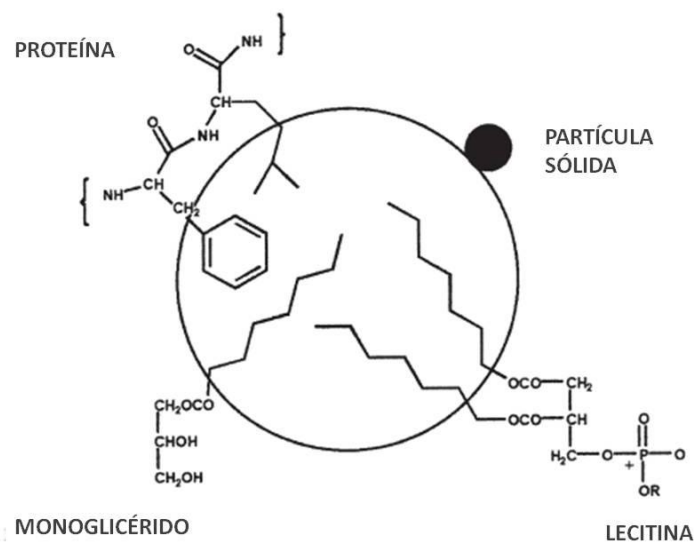


Figura 2.2. Esquema representativo de la disposición de las proteínas, monoglicéridos y lecitinas, al emulsionar una gota de aceite en una fase continua acuosa (Adaptado de Hasenhuettl, 2008).

2.2. FORMACIÓN DE UNA EMULSIÓN

El primer paso en la formación de una emulsión estable es la dispersión de una fase en la otra. Un factor crítico en el proceso de emulsificación es la formación de una capa monomolecular del emulsionante en la interfase aceite-agua. La formación de una emulsión conlleva un aumento considerable en el área superficial de las gotas dispersas en la fase continua, que depende del número y tamaño de las gotas. Para lograr formar y dispersar estas gotas, es necesaria la aplicación de una gran cantidad de energía (o trabajo), siendo los métodos más comúnmente utilizados para ello, la agitación mecánica y la homogeneización. Los compuestos surfactantes, al disminuir la tensión superficial en las gotas, reducen la cantidad de trabajo que hay que aplicar para formar la emulsión (Artz, 1990; Whitehurst, 2004).

En los Estados Unidos, al igual que en varios países, los emulsionantes de uso alimentario, junto con otros aditivos, están regulados por la Administración de Drogas y Alimentos (en Inglés, Food and Drug Administration o FDA). Existen dos tipos de aditivos según esta regulación: sustancias aceptadas como GRAS, del Inglés: Generally Recognized as Safe, (Generalmente reconocidos como seguros) (21CFR184); y aditivos directos (21CFR172). Las sustancias que han sido reconocidas como GRAS, dentro de las que se encuentran las lecitinas, normalmente tienen regulaciones menos estrictas (Gunstone, 2008; Hasenhuettl, 2008).

2.3. ESTABILIDAD DE EMULSIONES

El término estabilidad en una emulsión se refiere a la capacidad de la misma para resistir los cambios en sus propiedades a través del tiempo; cuando más estable es una emulsión, más lento es el proceso de cambio en sus propiedades (McClements, 1999). Existen varios parámetros que pueden alterar dramáticamente el carácter de la emulsión, y muchos son propios de las emulsiones alimenticias, como la presencia de algunos ingredientes (por ejemplo, proteínas), que presentan actividad superficial. Las condiciones de operación industrial o condiciones de procesado de alimentos, así como las de almacenamiento, pueden afectar la estabilidad de una emulsión. Los procesos que requieren altas temperaturas como la esterilización, son un ejemplo de ello.

2.3.1. PROCESOS DE DESESTABILIZACIÓN

Como ya se ha dicho, las emulsiones son sistemas metaestables; es decir que si bien son termodinámicamente inestables, pueden adquirir cierta estabilidad cinética cuando se controlan los procesos de desestabilización física. Dichos procesos pueden ser: separación gravitacional, floculación, coalescencia, coalescencia parcial, desproporción e inversión de fases (McClements, 1999). Algunos de los mismos se describen a continuación, y se esquematizan en la **Figura 2.3**.

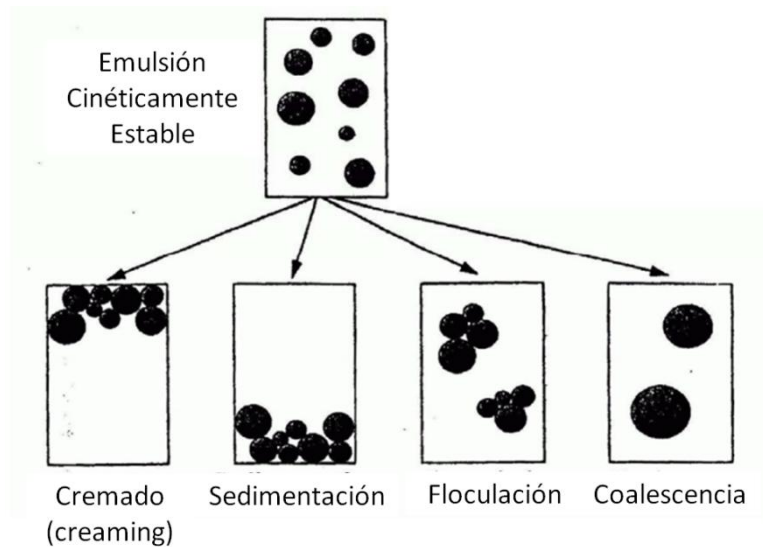


Figura 2.3. Esquema de los mecanismos de desestabilización de emulsiones más comunes (Adaptado de Neiryck, 2009).

Separación gravitacional (cremado/sedimentación): Es la separación causada por el movimiento ascendente (*cremado* en emulsiones o/w) o descendente (*sedimentación* en emulsiones w/o) de las gotas debido a su menor o mayor densidad que la fase continua, respectivamente. De acuerdo a la ley de Stokes, la velocidad de cremado en una emulsión es directamente proporcional al tamaño de la gota de la fase dispersa y a la diferencia de densidades de las fases dispersa y continua, e inversamente proporcional a la viscosidad de la fase continua.

Floculación: Las gotas en las emulsiones están en movimiento continuo por efecto de la energía térmica, la gravedad y las fuerzas mecánicas aplicadas. Esto favorece la colisión entre gotas, que pueden apartarse o quedar agregadas, dependiendo de la magnitud relativa de las fuerzas repulsivas y atractivas entre ellas. La floculación es el proceso en el cual dos o más gotas se unen para formar un agregado (flóculo). Cada gota retiene su identidad, sin fusionarse, llevando a una disminución en el número de partículas presentes en la emulsión.

Este proceso puede ser reversible o irreversible, dependiendo de las fuerzas que mantienen unidas a las gotas. La floculación está controlada por un equilibrio global entre las fuerzas de atracción (electrostáticas, de van der Waals, hidrofóbicas, etc.) y de repulsión (electrostáticas, estéricas, de hidratación).

Coalescencia: Es un proceso que genera un aumento del tamaño de las gotas y que conduce a la reducción del área interfacial. Se produce por aproximación, choque, deformación y ruptura de la película interfacial. Las gotas individuales se unen perdiendo su identidad y formando gotas más grandes. Este proceso depende de la frecuencia, energía y eficiencia de colisión entre gotas, como así también de la resistencia y viscoelasticidad de la película que rodea las gotas. El aumento de tamaño de gota acelera el proceso de cremado o sedimentación de las emulsiones. En emulsiones o/w la coalescencia conduce a la formación de una capa de aceite en la parte superior de la emulsión (“oiling off”), mientras que en emulsiones w/o lleva a la acumulación de agua en la parte inferior.

Inversión de fases: Consiste en el cambio de una emulsión o/w a una w/o, o viceversa. Puede producirse por una elevada fracción volumétrica de fase dispersa o por efecto de trabajo mecánico o aplicación de calor.

2.3.2. DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE GOTA

Numerosas propiedades de gran importancia en las emulsiones, tales como la estabilidad en el tiempo, la apariencia y la textura, están íntimamente ligadas con el tamaño de las gotas de la fase dispersa que contienen. Se dice que una emulsión es “monodispersa” cuando el tamaño de las gotas esféricas puede caracterizarse de manera completa e inequívoca a través de un solo parámetro: el radio (R) o el diámetro (D). Sin embargo, las emulsiones

alimenticias son generalmente “polidispersas”, es decir, el tamaño de todas las gotas varía dentro de un rango definido. Por lo tanto, el análisis suele hacerse en términos de una *distribución de tamaño de gota* (Cabezas, 2010).

La distribución del tamaño de gota puede representarse como una curva continua: la *función de distribución* $F(D_i)$. La función de distribución en número $F_n(D_i)$ se genera de manera tal que el área bajo la curva en el rango de dos diámetros D_i y $D_i + dD_i$ es igual al número de partículas en dicho rango, n_i , de tal manera que $n_i = F(D_i) \times dD_i$. A partir del mismo razonamiento pueden generarse las correspondientes funciones de distribución en superficie $F_s(D_i)$ y en volumen $F_v(D_i)$ asumiendo que las emulsiones están formadas por gotas esféricas:

$$F_s(D_i) = \pi D_i^2 F_n(D_i) \quad (2.1)$$

$$F_v(D_i) = \frac{1}{6} \pi D_i^3 F_n(D_i) \quad (2.2)$$

A partir de las funciones de distribución pueden calcularse los distintos *diámetros promedio*:

$$D[1, 0] = \frac{\sum n_i D_i}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i D_i}{N} \quad (2.3)$$

$$D[2, 0] = \frac{\sum n_i D_i^2}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i D_i^2}{N} \quad (2.4)$$

$$D[3, 0] = \frac{\sum n_i D_i^3}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i D_i^3}{N} \quad (2.5)$$

$$D[3, 2] = \frac{\sum n_i D_i^3}{\sum n_i D_i^2} \quad (2.6)$$

$$D[4, 3] = \frac{\sum n_i D_i^4}{\sum n_i D_i^3} \quad (2.7)$$

La determinación de los diámetros promedio $D[1,0]$ (en número), $D[2,0]$ (en superficie) y $D[3,0]$ (en volumen) requieren el conocimiento del número total de gotas. No obstante, puede prescindirse de dicha información mediante la utilización del diámetro promedio de Sauter ($D[3,2]$) y del diámetro promedio de De Brouker ($D[4,3]$), cuyas fórmulas no contienen el número total de gotas. Como puede verse, los valores de $D[3,2]$ y de $D[4,3]$ se relacionan con las distribuciones en superficie y volumen, respectivamente.

Existen distintos métodos para la determinación del tamaño de partícula, siendo el más utilizado el de difracción laser, en medio húmedo. La determinación experimental de la distribución del tamaño de partícula debe hacerse en condiciones de alta dilución y con agitación, de manera que las gotas se distribuyan de manera uniforme. Un pequeño volumen de la emulsión se coloca en un recipiente con agua y un haz de radiación láser incide sobre una celda interna transparente por donde recircula la emulsión diluida. La luz es dispersada en distintos ángulos por gotas de diferente tamaño, pasa por un complejo sistema óptico e incide posteriormente sobre un arreglo de detectores obteniéndose un patrón angular de luz dispersada. El software incorporado en el equipo permite traducir este patrón en la correspondiente distribución de tamaño de partícula (McClements, 1999).

2.3.3. BALANCE HIDROFÍLICO-LIPOFÍLICO

El concepto de *Balance Hidrofílico-Lipofílico* (HLB, por sus siglas en inglés) tiene sus bases en un método semiempírico ampliamente utilizado en la clasificación de surfactantes.

El HLB es un valor numérico que brinda información sobre la afinidad relativa de la molécula del surfactante por las fases acuosa y oleosa. A cada surfactante se le asigna este valor en relación a su estructura química. Una molécula con un alto HLB presenta una mayor cantidad de grupos hidrofílicos que lipofílicos, y viceversa. El HLB puede calcularse conociendo el tipo y número de los grupos hidrofílicos y lipofílicos presentes en la molécula o estimarse experimentalmente a partir de su punto de niebla o “cloud point”.

Un agente emulsificante con un bajo HLB (3-6) es predominantemente lipofílico, se disuelve preferentemente en la fase oleosa, estabiliza emulsiones w/o y forma micelas inversas en aceite. En cambio, un emulsificante con un alto HLB (8-18) es predominantemente hidrofílico, es decir se disuelve preferentemente en agua formando micelas y estabiliza emulsiones o/w. Las moléculas con valores de HLB intermedios (6-8) no poseen una afinidad preferencial hacia ninguna de las dos fases, y aquellas con un HLB inferior a 2 o superior a 18 no presentan actividad emulsificante, ya que se disuelven totalmente en alguna de las fases y no migran hacia la interfase agua-aceite (Bergensståhl & Alander, 1997; McClements, 1999).

La lecitina cruda nativa presenta valores bajos de HLB (3-4) y funciona muy bien en emulsiones w/o. Sin embargo, las lecitinas modificadas pueden funcionar tanto w/o como o/w, dependiendo del tipo de modificación y los parámetros específicos del sistema (pH, presencia de otros compuestos como proteínas, etc) (Braverman, 1999; Whitehurst, 2004; Nguyen y col., 2014). En la **Figura 2.4** se muestran ejemplos de valores HLB característicos de los diferentes tipos de lecitina, nativas o modificadas (Van Nieuwenhuyzen & Szuhaj, 1998).

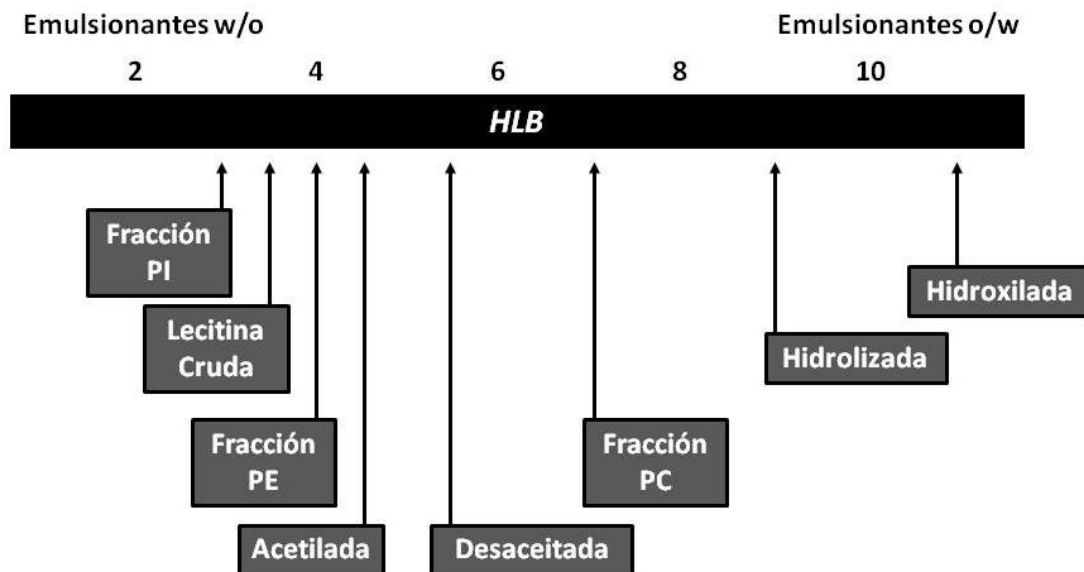


Figura 2.4. Valores de HLB para diferentes tipos de lecitinas nativas y modificadas (Adaptado de Van Nieuwenhuyzen & Szuhaj, 1998).

2.3.4. EMULSIONES ESTABILIZADAS POR PROTEÍNAS

Las proteínas son moléculas con actividad superficial por lo que actúan como emulsionantes (surfactantes). Éstas forman una fina película cohesiva alrededor de las gotas de aceite, lo que reduce la tensión superficial de la interfase agua/aceite, lo cual a su vez disminuye la cantidad de energía requerida para formar la emulsión. Al formar una capa protectora alrededor de las gotas de aceite, estabilizan la emulsión previniendo procesos de coagulación y coalescencia durante el almacenamiento. Existen productos que naturalmente contienen proteínas (como los productos lácteos), y éstas son las responsables principales de la estabilidad de la emulsión. Si se agregan otros surfactantes a este tipo de

productos pueden tener efectos sinérgicos con las proteínas, o desplazarlos de la interfase afectando la estabilidad de la emulsión.

Un ejemplo de una emulsión w/o estabilizada naturalmente por proteínas es la leche. En la leche cruda, la grasa está dispersa en forma de gotas pequeñas con un diámetro promedio de 4 μm . Estos glóbulos están envueltos en una capa superficial denominada membrana del glóbulo de grasa (MFGM, del inglés: milk fat globule membrane). La misma está compuesta principalmente de proteínas, glicoproteínas, enzimas, fosfolípidos, triglicéridos, glicolípidos, colesterol y otros componentes minoritarios. Esta capa actúa como agente emulsificante natural que evita la agregación y coalescencia de las gotas de grasa en la leche cruda y las protege de deterioro enzimático y oxidativo (Neiryck, 2009).

Los componentes mayoritarios de la leche son agua, lactosa, grasa y proteínas. Estas últimas pueden dividirse en dos categorías: las denominadas *caseínas*, que precipitan a $\text{pH} \leq 4,5$; y las denominadas *proteínas del suero*, que reciben ese nombre porque son las que permanecen en el sobrenadante luego de la precipitación de las anteriores.

Las caseínas son fosfoproteínas que representan aproximadamente el 80% del total del contenido de proteínas en la leche, dentro de las que se encuentran las α -, β - y κ -caseínas. Todas estas fosfoproteínas son moléculas flexibles que presentan un carácter anfifílico en su estructura primaria y por ello en la leche se encuentran en forma de agregados denominados *micelas de caseína*. Estas micelas son extremadamente estables frente a tratamientos térmicos gracias a la formación de láminas de moléculas de κ -caseína, que al extender su parte C-terminal en solución, provocan repulsión electrostática contra la agregación de las micelas (Neiryck, 2009; Singh, 2011).

Por otro lado, las proteínas del suero son típicas proteínas globulares con estructuras secundaria y terciaria bien definidas. El componente mayoritario de este grupo de proteínas es la β -lactoglobulina, mientras que la α -lactoalbumina, representa la segunda en importancia. En contraste con la alta estabilidad de las caseínas, la exposición de las proteínas del suero a altas temperaturas provocan su desnaturalización lo que origina su agregación (Anema, 2009; Neiryck, 2009; Dissanayake & Vasiljevic, 2009).

Según varios autores las proteínas del suero son las responsables de la inestabilidad térmica de las emulsiones lácteas o/w. Euston y col. (2000) sugieren que las proteínas del suero que se encuentran dispersas en la fase continua, que fueron desnaturalizadas por el calor, forman complejos con las que se encuentran adsorbidas en la superficie de las gotas, formando así flóculos de gotas de aceite unidos por agregados de proteínas. Esto se esquematiza en la **Figura 2.5**.

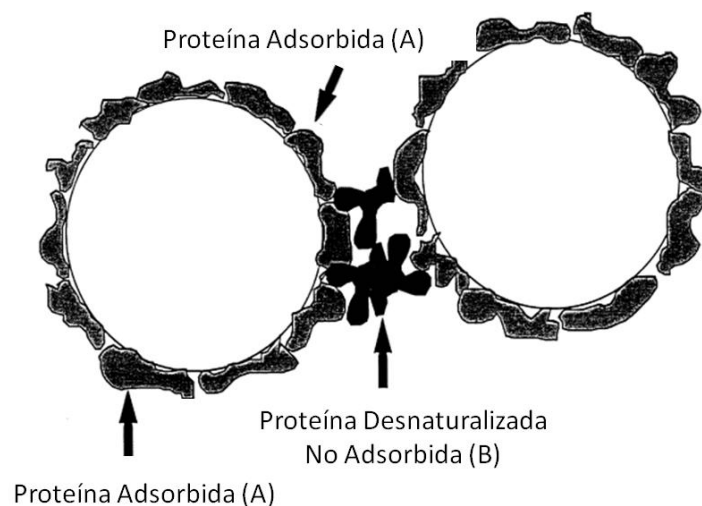


Figura 2.5. Representación esquemática de la estructura que podrían presentar los agregados en una emulsión láctea o/w sometida al calor. El agregado se forma por la interacción entre proteínas adsorbidas (A) y proteínas desnaturalizadas no adsorbidas (B) en la superficie de las gotas (Adaptado de Euston y col; 2000).

Este fenómeno provocado por tratamientos térmicos, en el que se observan la formación de complejos entre las proteínas del suero desnaturalizadas con micelas de caseína u otras proteínas del suero, se conoce como *coagulación térmica*. Una revisión más profunda de este proceso puede consultarse en Corredig & Dalgleish (1996); Verheul y col. (1998); Oldfield y col. (2000); y Singh (2004).

Los productos lácteos, normalmente son sometidos a tratamientos térmicos para asegurar su calidad microbiológica, por lo que es de gran importancia evitar este fenómeno para asegurar la estabilidad de la emulsión, y preservar las características del producto.

Existen varios estudios que sugieren que las lecitinas tienen un efecto beneficioso sobre la estabilidad térmica de este tipo de emulsiones, evitando la coagulación inducida por altas temperaturas (Hardy y col., 1985; Crujisen, 1996; Fang & Dalgleish, 1996; Tran Le y col., 2007; McSweeney y col., 2008; Kasinos y col., 2014). A esto se suma que McCrae (1999), Van der Meeren y col. (2005), Cabezas y col. (2011), y Tran Le y col. (2011) han reportado que la lecitina hidrolizada presenta mejores efectos de estabilización térmica de emulsiones o/w que la lecitina nativa. Más específicamente, Tran Le y col. (2007) han demostrado que la lecitina de soja hidrolizada reduce significativamente las interacciones inducidas térmicamente entre proteínas del suero y caseína.

Por lo expuesto en este capítulo se decidió evaluar el efecto de la modificación enzimática de la lecitina cruda de girasol en su calidad como emulsionante, estudiando el efecto del agregado de lecitina nativa y modificada en la estabilidad térmica de emulsiones lácteas. Este estudio se describirá en el capítulo 7.

2.4. BIBLIOGRAFÍA

- Anema, S. G. (2009).** Capítulo 8: The Whey Proteins in Milk: Thermal Denaturation, Physical Interactions and Effects on the Functional Properties of Milk. En *Milk Proteins: from Expression to Food* (pp. 239–281). Academic Press, San Diego.
- Artz, W. E. (1990).** Capítulo 10: Emulsifiers. En *Food Additives* (pp. 347–393). Marcel Dekker Inc, New York.
- Bergenstahl, B. A., & Alander, J. (1997).** Lipids and colloidal stability. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2(6), 590–595.
- Braverman, V. (1999).** Productos comerciales de lecitina. *Aceites Y Grasas, Marzo*, 111–116.
- Brummer, R. (2006).** Capítulo 4: Emulsions – Some Theoretical Aspects. En *Rheology Essentials of Cosmetic and Food Emulsions*. Springer-Verlag, Berlin.
- Cabezas, D. M. (2010).** *Modificaciones Tecnológicas de Lecitinas de Girasol. Aplicaciones en el Área Alimentaria*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Cabezas, D. M., Madoery, R., Diehl, B. W. K., & Tomás, M. C. (2011).** Application of enzymatic hydrolysis on sunflower lecithin using a pancreatic PLA₂. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 443–446.
- Corredig, M., & Dalgleish, D. G. (1996).** Effect of temperature and pH on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. *Food Research International*, 29(1), 49–55.
- Crujisen, J. M. M. (1996).** *Physical Stability of Caseinate-Stabilized Emulsions During Heating*. Tesis Doctoral. Univesidad de Agricultura de Wageningen, Países Bajos.
- Dissanayake, M., & Vasiljevic, T. (2009).** Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1387–97.
- Euston, S. R., Finnigan, S. R., & Hirst, R. L. (2000).** Aggregation kinetics of heated whey protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*, 14(2), 155–161.

- Fang, Y., & Dalgleish, D. G. (1996).** Comparison of the effects of three different phosphatidylcholines on casein-stabilized oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(4), 437–442.
- Gunstone, F. D. (2008).** *Phospholipid Technology and Applications*. Woodhead Publishing, Cambridge.
- Hardy, E. E., Sweetsur, A. W. M., West, I. G., & Muir, D. D. (1985).** Heat stability of concentrated milk: enhancement of initial heat stability by incorporation of food grade lecithin. *International Journal of Food Science & Technology*, 20, 97–105.
- Hasenhuettl, G. L. (2008).** *Food Emulsifiers and Their Applications* (2nd ed.). Springer, New York.
- Kasinos, M., Tran Le, T., & Van der Meeren, P. (2014).** Improved heat stability of recombined evaporated milk emulsions upon addition of phospholipid enriched dairy by-products. *Food Hydrocolloids*, 34, 112–118.
- McClements, D. J. (1999).** *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques*. CRC Press, New York.
- McCrae, C. H. (1999).** Heat stability of milk emulsions: phospholipid-protein interactions. *International Dairy Journal*, 9(3-6), 227–231.
- McSweeney, S. L., Healy, R., & Mulvihill, D. M. (2008).** Effect of lecithin and monoglycerides on the heat stability of a model infant formula emulsion. *Food Hydrocolloids*, 22(5), 888–898.
- Neiryneck, N. (2009).** *Physico-chemical Stability of Milk Protein-Stabilised Oil-in-Water Emulsions*. Tesis Doctoral. Universidad de Gante. Bélgica.
- Nguyen, M. T., Van de Walle, D., Petit, C., Beheydt, B., Depypere, F., & Dewettinck, K. (2014).** Mapping the chemical variability of vegetable lecithins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(7), 1093–1101.
- Oldfield, D. J., Singh, H., Taylor, M. W., & Pearce, K. N. (2000).** Heat-induced interactions of β -lactoglobulin and α -lactalbumin with the casein micelle in pH adjusted skim milk. *International Dairy Journal*, 10, 509–518.

- Schneider, M. (2008).** Capítulo 2: Major sources, Composition and Processing. En *Phospholipid Technology and Applications* (pp. 21 – 39). Woodhead Publishing, Cambridge.
- Singh, H. (2004).** Heat stability of milk. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2), 111–119.
- Singh, H. (2011).** Aspects of milk-protein-stabilised emulsions. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1938–1944.
- Tran Le, T., El-Bakry, M., Neiryck, N., Bogus, M., Hoa, H. D., & Van der Meeren, P. (2007).** Hydrophilic lecithins protect milk proteins against heat-induced aggregation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60(2), 167–173.
- Tran Le, T., Sabatino, P., Heyman, B., Kasinos, M., Dinh, H. H., Dewettinck, K., Martins, J., Van Der Meeren, P. (2011).** Improved heat stability by whey protein - surfactant interaction. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 594–603.
- Van der Meeren, P., El-Bakry, M., Neiryck, N., & Noppe, P. (2005).** Influence of hydrolysed lecithin addition on protein adsorption and heat stability of a sterilised coffee cream simulant. *International Dairy Journal*, 15(12), 1235–1243.
- Van Nieuwenhuyzen, W., & Szuhaj, B. F. (1998).** Effects of lecithins and proteins on the stability of emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 100(7), 282–291.
- Verheul, M., Roefs, S. P. F. M., & Kruif, K. G. De. (1998).** Kinetics of heat-induced aggregation of β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8561(46), 896–903.
- Whitehurst, R. J. (2004).** *Emulsifiers in Food Technology*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford.

CAPÍTULO III:
MATERIALES Y METODOLOGÍA
ANALÍTICA EXPERIMENTAL

3. MATERIALES Y METODOLOGÍA ANALÍTICA EXPERIMENTAL

En esta sección se describen los materiales utilizados para las reacciones de hidrólisis llevadas a cabo en esta tesis, y las técnicas analíticas implementadas para la determinación cualitativa y cuantitativa de los compuestos involucrados en la reacción.

Más adelante, en el capítulo 5, se describe una técnica analítica desarrollada en esta tesis para permitir la determinación cuantitativa y cualitativa de fosfolípidos y sus formas hidrolizadas (lisofosfolípidos y glicerofosfolípidos) mediante resonancia magnética nuclear de fósforo (^{31}P -NMR).

Los materiales y metodología experimental utilizados para evaluar el efecto de la composición de la lecitina modificada al ser aplicada como estabilizante en emulsiones de proteínas lácteas sometidas a tratamiento térmico intenso, se describen luego en el capítulo 6.

3.1. MATERIALES

3.1.1. LECITINA

La materia prima utilizada como sustrato para la hidrólisis fue lecitina cruda de girasol, obtenida en el proceso de desgomado acuoso, y fue gentilmente donada por Oleaginosa Moreno Hermanos S. A. (Argentina). En la sección 3.2 se describe la composición de esta lecitina y las distintas metodologías utilizadas para su caracterización.

3.1.2. ENZIMA

Como catalizador para las reacciones de hidrólisis se utilizó un preparado enzimático comercial denominado Lecitase® Ultra, gentilmente donado por Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca), en su forma libre. La enzima presenta actividad fosfolipasa A₁ (PLA₁; E.C.3.1.1.32). Es una carboxílico-hidrolasa de *Termomyces lanuginosus*/*Fusarium oxysporum* producida por la fermentación sumergida de un *Aspergillus oryzae* genéticamente modificado. La proteína enzimática obtenida mediante ingeniería proteica, se separa del organismo de producción y luego se purifica. El contenido de proteína en el preparado enzimático es de 6,5% (datos otorgados por el proveedor).

En la **Tabla 3.1** se detallan las especificaciones técnicas de la enzima utilizada en los ensayos de hidrólisis.

Tabla 3.1. Especificaciones técnicas de la enzima utilizada como catalizador para las reacciones de hidrólisis.

Enzima Fosfolipasa A₁ (PLA₁)^a
Nombre Comercial: Lecitase® Ultra
Forma física: Líquido color marrón
Origen: Fermentación sumergida de <i>Aspergillus oryzae</i> genéticamente modificado
Organismo de producción: <i>Aspergillus oryzae</i>
Organismo donador: <i>Thermomyces lanuginosus</i>
Unidades^b: 10000 Unidades lipásicas/ g
pH óptimo: No declarado
Temperatura óptima: No declarado
Requerimientos: No presenta
Inactivación: No declarado

^a Información suministrada por © Novozymes A/S (www.novozymes.com)

^b Medida de la actividad enzimática que se refiere a la cantidad de lipasa requerida para catalizar la reacción de 1 µmol/min de sustrato en condiciones determinadas de reacción.

3.1.3. REACTIVOS Y SOLVENTES

3.1.3.1. ESTÁNDARES Y REACTIVOS

Una mezcla comercial de metil-ésteres de ácidos grasos (FAMEs, del inglés fatty acid methyl esters) Supelco FAME Mix 37 (Supelco, Bellefonte, USA) fue utilizada para el análisis cualitativo de ácidos grasos libres por cromatografía capilar. Para el análisis cuantitativo de

los mismos se utilizó ácido láurico (99% pureza cromatográfica) de Fluka (Sigma–Aldrich, Steinheim, Alemania) como estándar interno.

Todos los estándares utilizados para la determinación cromatográfica de lípidos neutros (1,2,3-trioctadecanol-glicerol, 1,2,3-trihexadecanol-glicerol, 1,2,3-trioctadecadienol-glicerol, 1,2,3-tridecanol-glicerol, 1,2-distearol-3-palmitol-rac-glicerol, 1,3-dipalmitol-2-oleol-glicerol, 1,3-dioleol-2-palmitol-glicerol, 1,2-dilinoleol-3-palmitol-rac-glicerol, 1,2-dioleol-3-stearol-rac-glicerol, 1-palmitol-2-oleol-3-linoleol-rac-glicerol, 1,2-distearol-3-oleol-rac-glicerol, 1,3-dipalmitol-rac-glicerol, 1-monopalmitol-rac-glicerol, ácido oleico, tetradecano) fueron de pureza mayor al 98% y se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, EEUU). Además, se emplearon en el análisis de lípidos neutros los siguientes reactivos derivatizantes: piridina J.T. Baker (Philipsburg, EEUU) y N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) provista por Fluka (Buchs, Suiza).

Los estándares utilizados para la identificación y cuantificación de fosfolípidos y lisofosfolípidos por cromatografía líquida (HPLC-UV) (3-*sn*-fosfatidilcolina, 3-*sn*-fosfatidilinositol, 3-*sn*-fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico, fosfato de glicerol, 3-*sn*-lisofosfatidilcolina, 3-*sn*-lisofosfatidilinositol, 3-*sn*-lisofosfatidiletanolamina, y ácido lisofosfatídico) fueron en su mayoría de origen de soja, excepto la lisofosfatidiletanolamina que fue de yema de huevo y los ácidos fosfatídico y lisofosfatídico, sintéticos. Todos ellos fueron de pureza mayor al 98% y se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, EEUU).

Los hidróxidos de potasio y sodio fueron adquiridos de Cicarelli (San Lorenzo, Argentina), mientras que el acetato de sodio fue marca Anedra (España), todos grado reactivo analítico.

El agua grado HPLC fue de J.T. Baker Inc. (Phillipsburg, EEUU) y el agua MilliQ fue elaborada dentro del CCT-Bahía Blanca.

Los ácidos sulfúrico y acético glacial grado analítico fueron de Cicarelli (San Lorenzo, Argentina), mientras el ácido acético glacial grado cromatográfico fue provisto por Sintorgan (Buenos Aires, Argentina).

El hidróxido de amonio (25%, grado analítico) utilizado en la purificación de fosfolípidos fue de Cicarelli (San Lorenzo, Argentina)

3.1.3.2. SOLVENTES

En la **Tabla 3.2** se listan los solventes orgánicos utilizados en estas tesis, detallando grado, marca, y aplicación.

3.1.3.3. OTROS: SOLUCIONES BUFFER

Con el objeto de asegurar un pH constante durante toda la reacción de hidrólisis, se utilizaron soluciones buffer en el medio de reacción, para valores de pH de 5 y 8.

Para las reacciones con pH=5 se utilizó un buffer de acetato 0,1 M. Para la obtención de esta solución se preparó una solución de ácido acético (HAc) 0,2 M a partir de ácido acético glacial y una solución de acetato de sodio (AcNa) 0,2 M. La solución buffer a pH=5 se preparó mezclando 148 mL de solución de HAc 0,2 M con 352 mL de solución AcNa 0,2 M, completando a 1 L con agua destilada.

Para las reacciones con pH=8 se utilizó un buffer de Tris – HCl 0,05 M. Esta solución se preparó mezclando 250 mL de solución de Tris (tris-hidroximetil-aminometano) 0,2 M con 26,8 mL de solución de ácido clorhídrico (HCl, grado analítico) 1 N, completando a 1 L con agua destilada.

Tabla 3.2. Solventes orgánicos utilizados en las determinaciones analíticas y reacciones de hidrólisis.

Solvente	Grado	Marca	Usos
Acetona	Analítico	Anedra	Caracterización de lecitina cruda
Alcohol etílico	Analítico	Dorwil	Titulación AGLs
Alcohol isopropílico	Cromatográfico	UVE	Extracción L-L de AGLs
	HPLC	J.T. Baker	Determinación de PLs por HPLC
Cloroformo	Cromatográfico	UVE	Preparación de muestras para técnicas cromatográficas.
Eter Etílico	Cromatográfico	UVE	Purificación por SPE Validación de métodos por TLC
	Analítico	Dorwil	Titulación de AGLs
Heptano	Cromatográfico	UVE	Extracción L-L de AGLs
			Determ. de AGLs por CGC-FID
Hexano	Analítico	Dorwil	Caracterización de Lecitina Cruda Reacciones de hidrólisis Validación de métodos por TLC
			Cromatográfico
	HPLC	J.T. Baker	Determinación de PLs por HPLC
	Metanol	Cromatográfico	UVE
HPLC		J.T. Baker	Determinación de PLs por HPLC
Tolueno	Analítico	Dorwil	Caracterización de Lecitina Cruda

Abreviaturas:

AGLs: Ácidos grasos libres;

PLs: Fosfolípidos (phospholipids);

HPLC: Cromatografía líquida de alta performance (high performance liquid chromatography)

CGC: Cromatografía gaseosa capilar (capillary gas chromatography)

FID: Detector de ionización de llama (flame ionization detector)

SPE: Extracción en fase sólida (solid phase extraction);

TLC: Cromatografía en capa fina (thin layer chromatography).

3.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA LECITINA CRUDA DE GIRASOL (SIN MODIFICAR)

3.2.1. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA GENERAL

Para la caracterización química general de la lecitina cruda de girasol se utilizaron métodos oficiales de la American Oil Chemists' Society (Sección J, AOCS, 2003). Estos métodos se aplicaron en la determinación de materia insoluble en acetona (MIA %), materia insoluble en hexano (MIH %), humedad (H %) y valor ácido (VA). Una descripción de lo que indican estos parámetros se describe en el capítulo 1 (sección 1.4.3)

Con respecto al contenido de agua presente en la lecitina, los métodos estándares mencionados incluyen dos técnicas diferentes. La primera (Ja 2a-46) es un método de destilación del agua contenida en la lecitina utilizando un solvente inmiscible (tolueno), mientras que la segunda contempla la medición de humedad por titulación con el reactivo de Karl Fischer (Ja 2b-87). De las dos técnicas mencionadas se eligió la primera para la determinación del contenido de humedad en la lecitina cruda de girasol. El criterio de selección se basó en experiencias previas en el grupo (Penci, 2009) que sugieren resultados ligeramente superiores a lo esperado utilizando el método del reactivo de Karl Fischer en lecitinas de girasol. Esto puede deberse a que este último método involucra una reacción química con yodo por lo que las insaturaciones presentes en los ácidos grasos de la lecitina podrían interferir en la determinación.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3.3**, indicando el método utilizado en cada caso.

Tabla 3.3. Caracterización química general de lecitina cruda de girasol.

Determinación	Método	Valor ^a
Materia Insoluble en Acetona (MIA, %)	AOCS Ja 4-46	66,86 ± 0,66
Materia Insoluble en Hexano (MIH, %)	AOCS Ja 3-87	0,103 ± 0,015
Humedad (H, %)	AOCS Ja 2a-46	0,451 ± 0,060
Valor Ácido (VA)	AOCS Ja 6-55	22,94 ± 3,40

^a Media aritmética ± Desviación estándar, $n = 3$.

El contenido de aceite en la lecitina cruda puede estimarse con los resultados obtenidos en la caracterización general, ya que junto con los ácidos grasos libres representa la fracción soluble en acetona, resultando de aproximadamente 33% (m/m).

3.2.2. DETERMINACIÓN DE METALES

El análisis del contenido de metales en la lecitina cruda de girasol se llevó a cabo mediante espectrofotometría de absorción atómica utilizando un espectrofotómetro GBC 902 Atomic Absorption Spectrometer (GBC Scientific Equipment Pty Ltd, Dandenong, Australia), disponible dentro de los servicios brindados por la UAT del CCT-Bahía Blanca.

Para la preparación de las muestras, se pesaron aproximadamente 5 g de muestra de lecitina cruda de girasol, con una exactitud de 0,001 g, en un crisol de porcelana, y se calentó en una placa calefactora hasta el cese del desprendimiento de humo. La muestra totalmente carbonizada se llevó a mufla a 550 °C hasta obtener cenizas blancas. Luego se trataron las cenizas con 5-10 mL de HCl 6 N hasta que estuvieron totalmente impregnadas y se desecó

sobre placa calefactora. Luego se añadieron 15 mL de HCl 3 N, y se calentó nuevamente hasta ebullición; finalmente se enfrió y filtró con papel Whatman N° 541, recolectando el filtrado en matraz volumétrico de 100 mL. Se repitió el proceso anterior con 10 mL de HCl 3 N. El residuo de este último filtrado se lavó con agua y se filtró nuevamente recogiendo todos los lavados en el matraz de 100 mL. Se enfrió la solución proveniente de los lavados y se enrasó en 100 mL.

A las muestras para determinación de calcio, antes de enrasar en 100 mL se añadieron 5 mL de solución de cloruro de lantano.

Las muestras fueron enviadas para su determinación al Laboratorio de Rayos X de la UAT-CCT-BB, quienes informaron el contenido de metales en las mismas.

En la **Tabla 3.4** se muestra la composición de metales en la lecitina cruda de girasol utilizada como materia prima para las reacciones de hidrólisis.

Tabla 3.4. Contenido de metales en la lecitina cruda de girasol (mg/ g lecitina).

Contenido de Metales ^a			
Ca	Mg	K	Na
1,80 ± 0,04	4,03 ± 0,07	7,58 ± 0,08	6,80 ± 0,94

^a Media aritmética ± Desviación estándar, n = 4.

3.2.3. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS TOTALES EN LOS FOSFOLÍPIDOS Y TRIGLICÉRIDOS DE LA LECITINA CRUDA DE GIRASOL

Por último, se llevó a cabo la determinación de la composición total de ácidos grasos de la lecitina cruda de girasol (esto es, AGLs más AGs unidos en las moléculas de los lípidos) y sus fracciones: aceite y fosfolípidos, previo fraccionamiento por SPE (ver sección 3.3.1.3). La identificación y cuantificación de los mismos se llevó a cabo por cromatografía gaseosa, de acuerdo a los métodos IUPAC 2.301 y 2.302 (IUPAC, 1992). Este procedimiento requiere de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, obtenidos por transesterificación de los triglicéridos por metanolisis alcalina, posterior esterificación de los ácidos grasos en medio ácido y recuperación de los ésteres metílicos por extracción con hexano.

Las condiciones para la determinación cromatográfica son las mismas que para la determinación de ácidos grasos libres, y se describen en la sección 3.3.2.2

3.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS

3.3.1. PURIFICACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS PREVIO A LA DETERMINACIÓN

Como etapa previa a la determinación analítica de los compuestos de interés, se realizó la purificación y acondicionamiento de las muestras de manera de obtener un extracto de la fracción a analizar, según cada caso.

A continuación se describen las técnicas utilizadas para la purificación de las muestras, y luego se detallan las distintas técnicas analíticas utilizadas para la determinación cuali y cuantitativa de los compuestos de interés.

3.3.1.1. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DE ÁCIDOS GRASOS

Previo a la determinación de ácidos grasos, para la preparación y acondicionamiento de las muestras de lecitina cruda nativa e hidrolizada, se empleó una modificación del sistema planteado por Dole & Meinertz (1960) agregando una etapa de centrifugación y posterior purificación o “clean up”, según lo reportan Penci y col. (2010). Para la etapa de extracción se tomó una alícuota de 2 mL del medio de reacción, para la lecitina nativa (tiempo de hidrólisis = 0) y modificada, y se siguió con la extracción líquido-líquido (ELL) de los AGLs de la muestra. El sistema de extracción consta de tres etapas que se listan a continuación:

-Primera etapa: 10 mL de mezcla de alcohol isopropílico : heptano : ácido sulfúrico (4 : 1 : 0,1; v/v/v)

-Segunda etapa: 4 mL de agua MilliQ

-Tercera etapa: 6 mL de heptano

Las tres extracciones fueron realizadas de manera consecutiva (sin separaciones en las etapas intermedias), agitando enérgicamente durante 2 min luego de cada etapa, resultando en un sistema de dos fases. Este sistema de extracción ya ha sido utilizado por otros investigadores (Madoery y col., 1995; Maroto & Camuso, 2000) en la extracción de los ácidos grasos libres y la determinación del grado de hidrólisis mediante la titulación de alícuotas extraídas de la mezcla de reacción. Sin embargo, otros autores (Lio & Dennis, 1998; Penci y

col., 2010), sugieren la adición de etapas de centrifugación y posterior purificación, minimizando la cantidad de fosfolípidos en la interfase, consiguiendo de esta manera una mejor recuperación de los AGLs. Además, Pencic (2009), en su análisis cromatográfico de muestras de gomas de girasol y lecitinas de soja desaceitadas, observó la presencia de señales extrañas (picos) al final de los cromatogramas cuando estas etapas de centrifugación y purificación son omitidas. Esto reveló la presencia de compuestos altamente retenidos en la columna, los que podrían causar daños en el sistema y/o errores de identificación y cuantificación de los analitos de interés.

La centrifugación se llevó a cabo a 4500 rpm durante 1 min en tubos de centrifuga de 30 mL y 25 mm de diámetro interno. Luego de la tercera etapa, la fase superior u orgánica fue recolectada, y analizada por titulometría (sección 3.3.2.1) o evaporada y resuspendida en 15 mL de cloroformo para su posterior purificación en una columna de sílica-gel (“clean-up”, sección 3.3.1.2).

3.3.1.2. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DE SÍLICA-GEL (“CLEAN-UP”)

Como fase estacionaria para la purificación o “clean-up” de los extractos de AG se utilizó sílica-gel (70-230 mesh, calidad cromatográfica, Merk, Darmstadt, Alemania). La fuerza polar de la sílica empleada como fase estacionaria depende fuertemente del contenido de agua, siendo a la vez una sustancia muy higroscópica. Por ello, para estandarizar la fuerza polar y por consiguiente la capacidad y selectividad en la retención de compuestos, la sílica-gel se acondicionó mediante calentamiento a 500 °C en mufla durante 8 h para remover la humedad, posterior enfriamiento en desecador y rehidratación agregando un 2% (m/m) de agua. Inmediatamente después del acondicionamiento, se empacó 1 g de esta sílica-gel

hidratada con ayuda de 10 mL de cloroformo en una columna de vidrio de 15 mm de diámetro provista de un robinete de teflón. La preparación de la columna se completó con el acondicionamiento de la fase estacionaria utilizando 15 mL de cloroformo y posterior siembra del extracto de AGLs.

Para la elución de los compuestos, fue necesario verificar la aplicabilidad de las técnicas encontradas en bibliografía debido a que no han sido reportadas para exactamente el mismo tipo de muestras utilizadas en esta tesis. En efecto, se encontró información para purificación de lecitinas desaceitadas, o aceites vegetales crudos y refinados, pero no para lecitinas crudas nativas y modificadas por hidrólisis. Se tomó como punto de partida la técnica sugerida por Penci (2009), cuyas características se muestran en la **Tabla 3.5**, a fin de agregar las modificaciones necesarias según las diferencias entre el tipo de muestras utilizadas.

Tabla 3.5. Técnica de clean-up tomada como referencia para la purificación de AGLs en las muestras de lecitina cruda de girasol nativa e hidrolizada (Penci, 2009).

Purificación de AGLs según Penci (2009)	
Tipo de muestras utilizada	Lecitina de soja y goma de girasol desaceitadas
Siembra	1,5 mL de muestra obtenida en la extracción L-L
Etapas de Elución	1 sola etapa, para AGLs, con 15 mL de cloroformo: ácido acético 99:1 (v/v) como fase móvil

Para determinar la eficacia de las modificaciones realizadas se llevó a cabo una verificación utilizando cromatografía en capa fina o TLC (ver sección 3.3.1.4).

Debido a que las muestras utilizadas en esta tesis presentan un contenido importante de aceite (32% m/m), fue necesario agregar una etapa previa a la elución de AGs, utilizando cloroformo (grado cromatográfico) para eliminar los TGs de las muestras. Se probó con distintos volúmenes de elución (alícuotas de 5 mL) hasta verificar que no se observara la presencia de TGs en el volumen recolectado. Además, estudios de recuperación en lecitinas de soja y girasol desaceitadas con agregado de ácido oleico muestran que mediante la elución de AGs con 20 mL de la mezcla cloroformo: ácido acético 99:1 (v/v) como fase móvil, se obtienen porcentajes de recuperación del 98-108% (Penci y col., 2010). Para comprobar esto, se investigó si luego de la elución de AGs con 20 mL de la mezcla mencionada de solventes como fase móvil, no permanecían AGs retenidos en la columna. Para ello se continuó con la elución de alícuotas de 5 mL de la fase móvil hasta verificar que en el eluato no se observara la presencia de AGs.

Se encontró que utilizando 15 mL de cloroformo se eliminaba por completo el contenido de lípidos neutros (TGs+ DGs + MGs), y con el uso de 20 mL de cloroformo: ácido acético 99:1 (v/v) se recuperaba la totalidad de AGLs presentes en la muestra, dentro de los límites de detección de la TLC. En resumen, con respecto a la metodología indicada en Penci y col. (2010) fue necesario incorporar una primera etapa de elución consistente en 15 mL de cloroformo a fin de extraer los TGs, DGs y MGs contenidos en las lecitinas crudas utilizadas.

En la **Figura 3.1** se muestra un esquema de la purificación o clean-up.

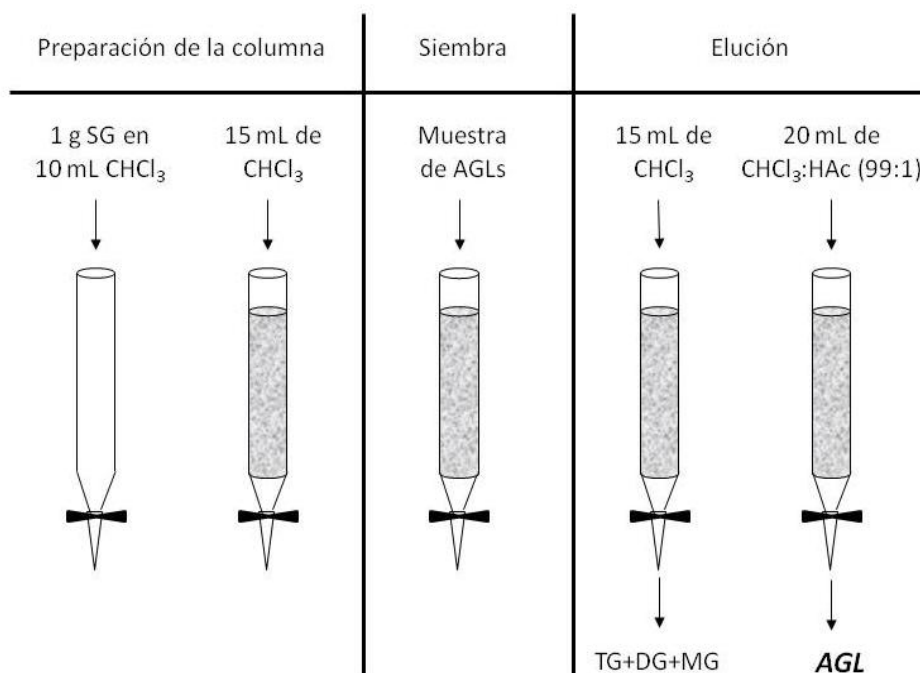


Figura 3.1. Esquema del “clean-up” o purificación de ácidos grasos libres (AGLs) por cromatografía en columna de sílica-gel (SG).

3.3.1.3. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLS Y LNS

La determinación de lípidos neutros (LNs) y PLS presentes en la lecitina cruda nativa y sus productos de hidrólisis mediante técnicas cromatográficas, requiere una previa separación de los lípidos polares y los de baja polaridad. Los lípidos polares (PLs y LPLs) pueden interferir en la determinación por cromatografía gaseosa de LNs, además de causar daños en la columna capilar. Por otra parte, en la determinación de PLS y LPLs por cromatografía líquida (HPLC) en columna de fase normal, los compuestos de baja polaridad (TGs, DGs, MGs y AGLs) son poco retenidos, generando un frente (o picos) posterior a la salida del solvente, que puede generar interferencia en la identificación y/o cuantificación de los analitos de interés.

La manera clásica de separar los PLs de otros compuestos lipídicos presentes en la lecitina cruda (TGs, DGs, MGs, y AGLs) es utilizando la extracción con acetona fría (0 °C), como se describió en el capítulo 1 (sección 1.4.2). Debido a la insolubilidad de estos compuestos en acetona, los PLs precipitan y pueden ser fácilmente separados por centrifugación. Sin embargo, en las lecitinas modificadas, la presencia de LPLs invalida la aplicación de este procedimiento debido a que los mismos son parcialmente solubles en acetona (Wendel, 2000).

Por ello, se buscó un método de purificación que permita una buena separación de los lípidos neutros y polares, asegurando la recuperación completa de ambos en cada extracto, para su posterior determinación analítica. Esto permitió la implementación de un solo método de purificación, obteniendo los analitos de interés a partir de la misma muestra, minimizando la cantidad de muestras de reacción a preparar y los tiempos utilizados en la preparación y acondicionamiento de las mismas. La técnica de purificación utilizada fue una extracción en fase sólida (SPE), metodología que fue desarrollada por el grupo de Ingeniería de Alimentos de PLAPIQUI, para el análisis de PLs en aceites crudos y desgomados de girasol (Carelli y col., 1997). Esta técnica fue a su vez modificada luego por Penci (2009), adaptando la metodología a muestras de lecitina de soja y gomas de girasol desaceitadas. Como las muestras de lecitina cruda nativa e hidrolizada de girasol difieren de las utilizadas previamente por estos miembros del grupo, se tomó como punto de partida la metodología reportada por Penci (2009), verificando que se adaptara correctamente a las muestras utilizadas en esta tesis, validando la metodología implementada mediante la verificación por TLC (ver sección 3.3.1.4).

Como primer paso para la purificación de las muestras utilizando esta metodología debe eliminarse el contenido de agua. Para ello, las muestras de lecitina nativa e hidrolizada

fueron liofilizadas utilizando un equipo discontinuo (Liofilizador de bandejas, Modelo L-A-B4-C, Rifcor S.A., Argentina). Las alícuotas de 2 mL del medio de reacción, conservadas en freezer a -18 °C, se sumergieron en nitrógeno líquido a -195 °C, durante 10 min y se colocaron en el equipo para su liofilización. En la **Tabla 3.6** se detallan las condiciones operativas para el proceso de liofilización en el equipo discontinuo.

Luego de la liofilización, las muestras fueron resuspendidas en 10 mL de cloroformo (grado cromatográfico) obteniendo una concentración de aproximadamente 3-4 mg de PLS/mL de cloroformo.

Luego, como ya se mencionó, se llevó a cabo la purificación mediante extracción en fase sólida, empleando la técnica descrita por Carelli y col. (1997), y modificada por Penci (2009).

Tabla 3.6. Condiciones operativas del proceso de liofilización de muestras de lecitina cruda de girasol (nativa y modificada).

Condiciones Operativas del Proceso de Liofilización	
Presión	0,009 mmHg
Tiempo	48 h
Temp. Condensador	-52 °C
Acondicionamiento de las muestras	Inmersión en N ₂ líquido (-195,8 °C), 10 min.

Para ello se utilizaron cartuchos de extracción comerciales de fase diol (SPE- cartuchos de fase Diol, 500 mg, J.T. Baker Inc., Phillipsburg, EEUU).

La fase estacionaria en el cartucho se acondicionó con 2 mL de metanol, 2 mL de cloroformo y 2 mL de hexano (todos los solventes fueron de grado cromatográfico).

Luego se sembró una alícuota de 0,7 mL de muestra disuelta en cloroformo (conteniendo entre 2-3 mg de PLs), y se continuó con la elución de las distintas fracciones de interés. En la **Figura 3.2** se muestra un esquema de la técnica de purificación utilizada.

La elución se realizó en tres etapas, con los siguientes volúmenes de fase móvil:

- Primera etapa: 2 mL de cloroformo (eluyen los TGs, DGs y MGs)
- Segunda etapa: 2 mL de éter etílico (eluyen los AGLs)
- Tercera etapa: 7 mL de mezcla de solución de amoníaco en metanol

La solución de amoníaco en metanol se preparó con 100 μ L de solución amoniacal al 25% (m/m) en 100 mL de metanol.

Las fracciones correspondientes a la primera y segunda etapa se recolectaron juntas en un mismo vial, mientras que por otro lado, la fracción correspondiente a la última etapa se colectó en otro vial cónico. Ambas fracciones se llevaron a sequedad y se conservaron en freezer a -18 °C para su posterior determinación cromatográfica (secciones 3.1.3 y 3.1.4).

La purificación de las muestras se realizó por duplicado.

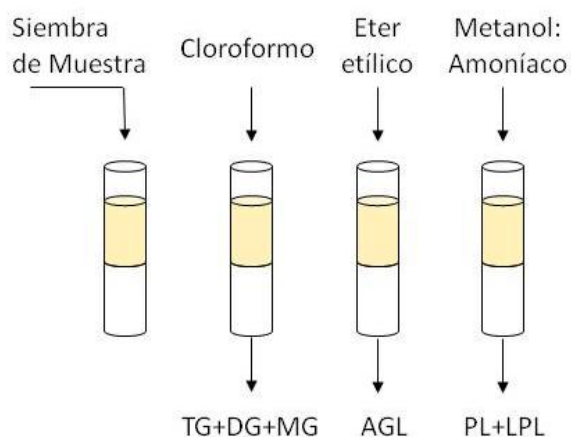


Figura 3.2. Extracción y purificación de las fases polar (PL+LPL) y apolar (TG+DG+MG y AGL), como preparación de las muestras previo a la determinación cromatográfica.

3.3.1.4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE PURIFICACIÓN

Como se comentó en las secciones anteriores, las metodologías encontradas en bibliografía para la purificación de las muestras no han sido reportadas para exactamente el mismo tipo de muestras utilizadas en esta tesis, sino que se encontró información para purificación de lecitinas desaceitadas o aceites vegetales crudos y refinados, pero no para lecitinas crudas nativas y modificadas por hidrólisis. Por ello, se decidió verificar la efectividad de los métodos de purificación para la determinación de los productos y reactivos en la reacción de hidrólisis de lecitina cruda de girasol, mediante cromatografía en capa fina (TLC).

La TLC es una técnica semicuantitativa que permite identificar los diferentes compuestos presentes en una muestra, siempre y cuando se utilicen las fases móvil y estacionaria apropiadas para los compuestos de interés. El método se basa en la afinidad relativa del compuesto por la fase estacionaria (en este caso la placa de sílica) en comparación con el solvente. En la TLC el factor de retención de un compuesto es la longitud de avance del

mismo desde el lugar donde se sembró en la placa, dividida por la distancia recorrida por el solvente (frente de avance), medida desde el mismo punto de partida (siembra); este factor depende no sólo del compuesto sino también del solvente y el material de la placa utilizado.

Para la verificación por TLC, se emplearon placas de sílica sobre base de aluminio de 20 cm x 20 cm (Kieserlburg 60, Merk). La TLC se corrió en una sola dirección a saturación empleando la siguiente mezcla de solventes: hexano/ éter etílico/ ácido acético (80 mL/ 20 mL/ 2 mL). Luego la placa fue revelada empleando atmósfera de yodo.

Para la identificación de los compuestos se utilizó: aceite refinado comercial de girasol para identificar TGs; aceite crudo de girasol hidrolizado, que contiene todos los compuestos de interés; ácido oleico para identificar AGLs, y estándares puros para cromatografía (1-monopalmitol-rac-glicerol; 1,3-dipalmitol-rac-glicerol; y 3-*sn*-fosfatidilcolina) para identificar MGs, DGs y PLs.

Para la validación de las metodologías se utilizaron muestras de lecitina hidrolizada durante 1 h de reacción, ya que el contenido de AGLs en la lecitina nativa es muy pequeño para ser apreciado en la imagen de la placa de sílica-gel revelada.

Para la verificación de la purificación de AGLs por clean-up, se tomaron muestras provenientes de la extracción L-L y se realizó la purificación, eluyendo 4 alícuotas de 5 mL de cloroformo (fase móvil para eluir TGs) y luego 5 alícuotas de 5 mL de la mezcla cloroformo: ácido acético 99:1 (v/v) como fase móvil para eluir AGLs.

En la **Figura 3.3** se muestra una placa revelada en atmósfera de yodo utilizada para la validación de la purificación de AGLs (clean-up). En la misma, pueden verse muestras sembradas como patrones para identificar los factores de retención de cada compuesto (Aceite: TGs; LPC: PL y LPLs; Ácido Oleico: AGLs).

En dicha figura se muestran tres extractos diferentes. El extracto A correspondiente a la fracción recolectada luego de pasar 15 mL de cloroformo, comprobándose la ausencia de AGLs en dicha fracción. El extracto B correspondiente a la elución con 20 mL de cloroformo: ácido acético 99:1 (v/v), donde se observa la presencia solamente de AGLs. Por último el extracto C correspondiente a una última elución con 10 mL más de cloroformo: ácido acético, verificándose que los AGLs habían sido recolectados en su totalidad y que no había quedado una fracción en la columna.

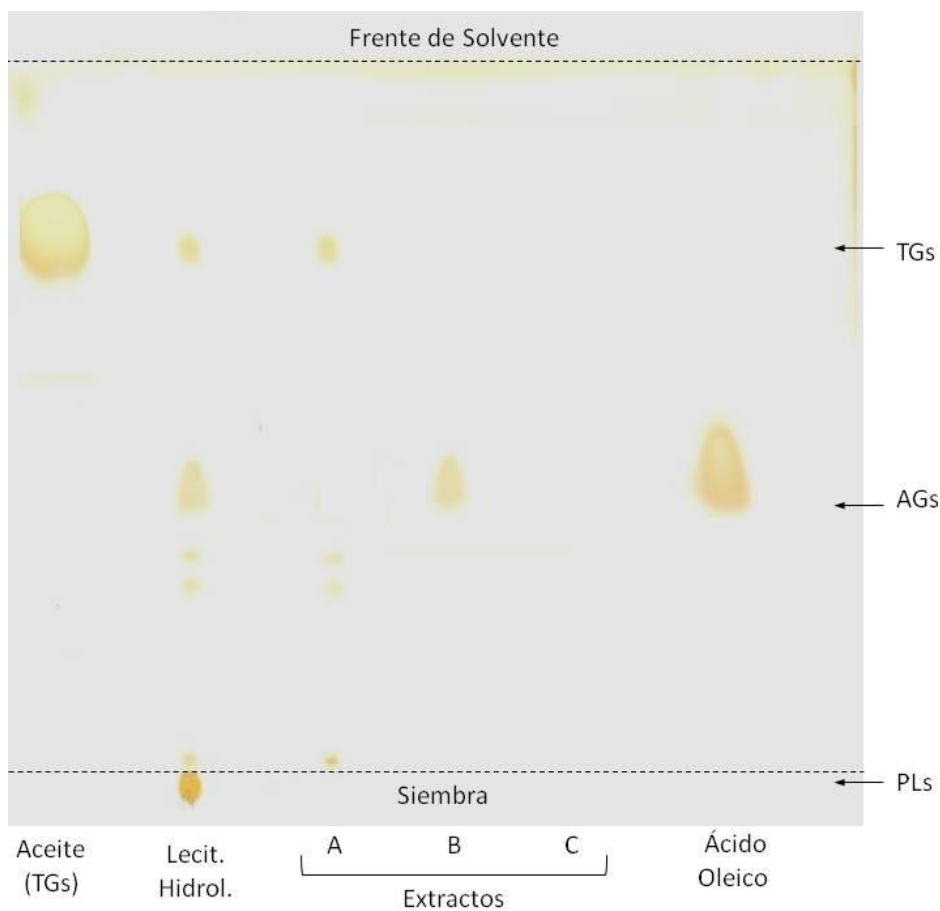


Figura 3.3. Placa de TLC para la verificación del método de purificación por cromatografía en columna o clean-up. Los extractos corresponden a distintas etapas del método (**A**: remoción de TGs con 15 mL de cloroformo; **B**: elución de AGs con 20 mL CHCl_3 :HAc; **C**: posterior elución con 10 mL de CHCl_3 :HAc para verificar que no hayan quedado AGs retenidos en la columna).

Para la validación de la purificación con cartuchos de fase diol (SPE), se tomaron muestras de reacción liofilizadas y resuspendidas en cloroformo y se realizó la purificación, pasando alícuotas extras de las fases móviles, para corroborar que los distintos compuestos de interés hayan sido eluidos en su totalidad sin quedar fracciones retenidas en la columna.

La **Figura 3.4** muestra una placa revelada en atmósfera de yodo utilizada para la validación de la purificación por SPE.

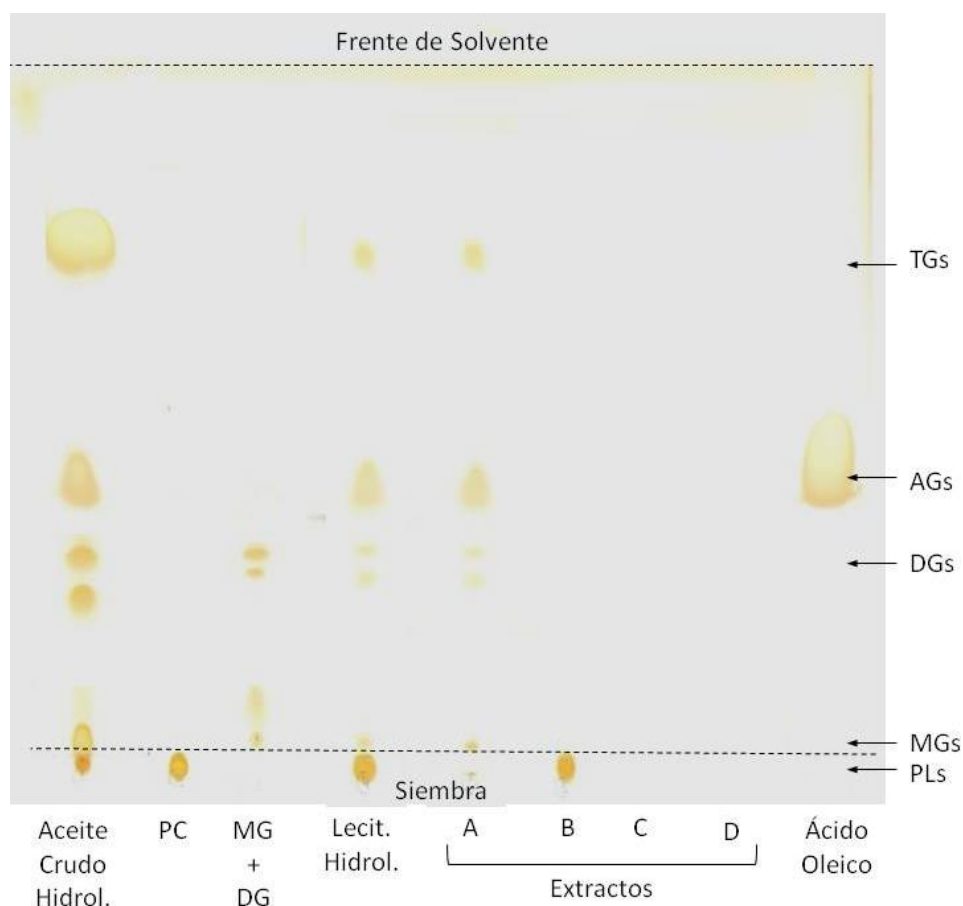


Figura 3.4. Placa de TLC para la verificación del método SPE (cartuchos de fase diol). Los extractos corresponden a las muestras recolectadas luego de la 1° y 2° extracción (con cloroformo y éter etílico) (A), tercer extracción (con metanol:amoníaco) (B), posterior elución con 5 mL de metanol:amoníaco (C) y por último la fracción recuperada luego de una elución extra con 5 mL de cloroformo, y 5 mL de éter etílico (D).

En la figura puede observarse que en el extracto correspondiente a la fracción de LNs + AGLs no hay presencia de PLs, y viceversa (extractos A y B respectivamente). Los extractos C y D corresponden a las alícuotas extras de fase móvil utilizadas para verificar la ausencia de analitos sin eluir, lo que queda comprobado en la figura, al no observarse manchas en los extractos correspondientes.

3.3.2. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Para la determinación de ácidos grasos se utilizaron dos técnicas diferentes durante la realización de esta tesis. La primera, sólo de cuantificación, consiste en una simple titulación, previa purificación y extracción de los ácidos grasos libres (AGLs). La segunda, es una técnica que permite la identificación y cuantificación del perfil de ácidos grasos utilizando cromatografía gaseosa capilar, con detector de ionización de llama (CGC-FID).

3.3.2.1. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR TITULOMETRÍA

La determinación cuantitativa de los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis y los presentes en estado libre en la materia prima, se llevó a cabo mediante el método oficial de la AOCS Ca 5a-40 (Sección C, AOCS, 2003).

Se tomaron alícuotas de 2 mL del medio de reacción para diferentes tiempos (de 0 a 24 h), el equivalente a 40 mg de lecitina cruda de girasol. Los AGLs presentes en las muestras fueron extraídos según se describe en la sección 3.3.1.1. A la fase superior recolectada (fase orgánica) se le incorporó un volumen de 5 mL de mezcla alcohol etílico: éter etílico (1:1 v/v) y luego se tituló con una solución 0,1 N de KOH en etanol, o sus correspondientes diluciones utilizando una microbureta y fenolftaleína como indicador.

3.3.2.2. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR CGC-FID

Para conocer la distribución de los ácidos grasos en las muestras fue necesario recurrir a una metodología que permita la identificación de los mismos, además de su cuantificación.

Para ello se utilizó una técnica de cromatografía gaseosa capilar con detector de llama (CGC-FID) (Penci y col., 2010)

3.3.2.2.1. PREPARACIÓN DE METIL ÉSTERES DE AGS (FAMES)

Para que los AGs puedan ser determinados mediante cromatografía gaseosa deben derivatizarse a compuestos más volátiles, como sus ésteres metílicos (FAMES). El estándar interno utilizado para la cuantificación (C12:0, ver sección 3.3.2.2.2), se adicionó a la muestra antes de la preparación de FAMES, de manera que experimente las mismas variaciones que los analitos, minimizando los errores en la cuantificación que puedan originarse a partir de ésta etapa.

La **Figura 3.5** muestra la reacción de metilación de AGs en medio ácido.

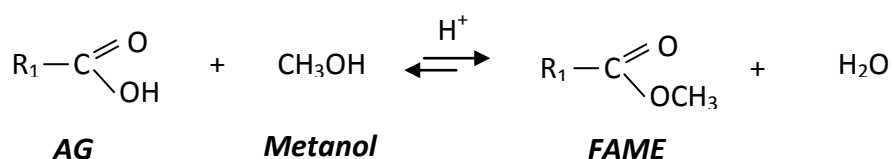


Figura 3.5. Reacción de metilación de ácidos grasos para la preparación de sus correspondientes metilésteres (FAMES) en medio ácido.

La muestra purificada de AGLs provenientes de la etapa de clean-up se colectó en un matraz para reflujo de 75 mL, se agregó el estándar interno para cromatografía, se llevó a sequedad y se resuspendió en 1 mL de hexano (grado cromatográfico).

Luego se agregaron 6 mL de una solución al 5-6% de ácido sulfúrico en metanol (grado cromatográfico), y se calentó a reflujo por 20 minutos sobre placa calefactora, controlando de no permitir la ebullición. Para detener la reacción se agregaron aproximadamente 75 mL de una solución de cloruro de sodio saturada.

La extracción de los FAMES producidos se realizó agregando 2 mL de hexano (grado cromatográfico) y se agitó vigorosamente durante 2 min. La fase superior (hexano + FAMES) fue extraída con pipeta Pasteur y 1 mL de esta solución fue llevada a sequedad y resuspendida en 300 μ L de hexano para su determinación por cromatografía gaseosa (CGC-FID).

3.3.2.2.2. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA

La identificación y cuantificación de los AGLs se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases 4890D (Agilent, Hewlett-Packard) equipado con un detector FID. La temperatura del inyector y detector se mantuvieron constantes a 220 °C. Se utilizó una columna capilar SP-2380 (30 m x 0,25 mm x 0,2 μ m; Supelco Inc., Bellefonte, PA). La temperatura de la columna se mantuvo a 170 °C durante 10 min para luego incrementarse hasta 210 °C a una velocidad de 4 °C/min, para permanecer luego 25 min a dicha temperatura. Como gas portador se empleó hidrógeno. El volumen de muestra inyectado fue de 1 μ L. Se utilizó una relación de split de 1:100. La cuantificación de los compuestos se llevó a cabo mediante el método del estándar

interno y la adquisición de datos y la integración de los picos se llevó a cabo con el Software HP 3398A GC Chemstation (Hewlett Packard Company).

El método del estándar interno para la cuantificación de los compuestos tiene la ventaja de eliminar los problemas de fluctuación experimental y minimizar los errores de operación, ya que el analito y el estándar interno experimentan las mismas variaciones. Como estándar interno se eligió el ácido láurico (C 12:0), ya que es un ácido graso típico de grasa láctea (Hettinga, 2005) y no se encuentra presente en lecitinas de girasol, que es el sustrato utilizado en esta tesis. Además de que posee una adecuada resolución cromatográfica y el mismo factor de respuesta que los AG analizados, en las condiciones instrumentales seleccionadas (Penci, 2009).

Se preparó una solución del estándar interno en hexano (grado cromatográfico) de 0,3 mg/mL, incorporándose 500 µL de esta solución a la fracción purificada de ácidos grasos proveniente de la etapa de “clean-up”, previo a la derivatización a FAMES. En la **Tabla 3.7** se resumen los pasos llevados a cabo para la determinación de la distribución de AGLs en las lecitinas crudas de girasol nativas e hidrolizadas.

La preparación y acondicionamiento de las muestras y la determinación cromatográfica fueron realizadas por duplicado.

Tabla 3.7. Resumen de la metodología implementada para la determinación de AGs en la lecitina cruda de girasol (nativa e hidrolizada).

Determinación Cromatográfica de AGs - Resumen	
Etapa	Resumen del Método
Extracción L-L de AGLs	<ul style="list-style-type: none"> -Tomar una alícuota de 2 mL del medio de reacción (aprox. 40 mg de lecitina) -Colocar en ampolla de decantación y agregar 10 mL de mezcla isopropanol: heptano: ácido sulfúrico (4:1:0,1; v/v/v). Agitar 2 min -Agregar 4 mL de agua MilliQ. Agitar 2 min -Agregar 6 mL de heptano. Agitar 2 min -Dejar separar las fases, colectarlas suavemente en un tubo de centrifuga de 30 mL, lavando la ampolla con 2 mL de heptano -Centrifugar 4500 rpm durante 1 min -Colectar la fase orgánica (superior), llevar a sequedad y resuspender en 15 mL de cloroformo.
Clean-up de AGLs	<ul style="list-style-type: none"> -Acondicionar sílica-gel 60 a 500 °C durante 8 h -Activar la sílica con agua MilliQ (2% m/m) -Suspender 1 g sílica en 10 mL de cloroformo y colocarla en una columna de 15 mm de D, acondicionando la columna luego con 10 mL de cloroformo -Sembrar 1,5 mL de muestra obtenida en la extracción (resuspendida en cloroformo) -Eluir con 15 mL de cloroformo -Eluir con 20 mL de cloroformo: ácido acético 99:1 (v/v) -Colectar en matraz de metilación
Preparación de FAMES	<ul style="list-style-type: none"> -Agregar al extracto purificado el estándar interno (500 µl de una solución de 0,3 mg/mL de C12:0 en hexano. Evaporar y resuspender con 1 mL de hexano -Colocar 6 mL de ácido sulfúrico en metanol al 5-6% y calentar a reflujo sin ebullición durante 20 min -Detener la reacción con solución saturada de NaCl (aprox. 75 mL) -Agregar 2 mL de hexano y agitar vigorosamente durante 2 min para extraer los FAMES -Colectar 1 mL de la capa orgánica (superior), llevar a sequedad y resuspender en 300 µL de hexano
Análisis Cromatográfico	<ul style="list-style-type: none"> -Inyección: 1 µL de la solución de FAMES obtenida -Inyector: Split/splitless en modo Split (1:100). $T_{iny} = 220\text{ °C}$ -Equipo: Agilent 4890D – Detector FID. $T_{FID} = 220\text{ °C}$ -Columna capilar SP-2380, 30 m x 0,25 mm x 0,5 µm -Horno: T = 170 °C durante (10 min)-rampa de 4 °C/min hasta 210 °C- 25 min a T constante (210 °C). -Gas carrier: H₂

3.3.3. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS NEUTROS

El análisis de la composición en lípidos neutros (TGs, DGs y MGs) de la lecitina de girasol modificada y de la materia prima, se llevó a cabo mediante cromatografía gaseosa capilar (CGC-FID), utilizando una adaptación de las normas internacionales (Método IRMM EUR 20831 EN). Esta técnica, desarrollada previamente en el grupo de investigación por Pacheco (2012), permite la identificación y cuantificación simultánea de triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol en muestras de aceite de girasol. Sin embargo para las muestras utilizadas en esta tesis, no se logró una resolución adecuada para los AGLs, en las muestras de hidrólisis con alto contenido de estos compuestos. Por ello, se reportarán sólo los resultados obtenidos mediante el análisis de AGLs individualmente, previa metilación a FAMEs (sección 3.3.2.2).

3.3.3.1. DERIVATIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

Así como fue necesaria la metilación de los AGs previo a su cromatografía, los grupos hidroxilo libres de los MGs y DGs deben ser derivatizados de manera de incrementar sustancialmente tanto la volatilidad como la estabilidad térmica de estos compuestos. Pacheco y col. (2014) sugieren la silylación de los compuestos, siendo que este procedimiento asegura además excelentes formas de pico, bajos límites de detección y mejora considerablemente la robustez del método cromatográfico (Plank & Lorbeer, 1995).

Para la derivatización se utilizó el método propuesto por Pacheco y col. (2014), tomado de Plank & Lorbeer (1995). El mismo consiste en agregar a la muestra MSTFA como agente derivatizante y piridina como catalizador de la reacción. El agregado de piridina permite

Llevar a cabo la reacción a temperatura ambiente sin necesidad de la aplicación de calor. El tiempo de reacción es de sólo 15 minutos.

Se tomaron las muestras provenientes de la purificación por SPE (cartuchos de fase diol) y se disolvieron en 2 mL de cloroformo. Se tomó una alícuota de 1 mL de esta solución y se colocó en el vial para la derivatización. Se llevó a sequedad y se disolvió en 15 μ L de piridina. Este procedimiento se llevó a cabo para que la concentración aproximada de la muestra a analizar en la solución a inyectar sea de 10 mg/mL.

Por otra parte se prepararon las soluciones de los compuestos puros utilizados como estándares internos para la determinación, utilizando piridina como solvente, con las siguientes concentraciones:

- Solución tetradecano (TD): 10,60 mg/mL
- Solución de tricaprina (TC): 10,60 mg/mL
- Solución de tripalmitoleína (PoPoPo): 5,00 mg/mL

Luego se agregaron al vial de derivatización 4,5 μ L de solución de TD, 4,5 μ L de solución TC y 5,2 μ L de solución de PoPoPo. Por último se agregaron 28 μ L de MSTFA y se dejó que la reacción de sililación ocurra durante 15 min. Transcurrido este tiempo un volumen de 1 μ L fue inyectado en el cromatógrafo para su determinación.

Cabe destacar que, previamente a ser utilizadas, las soluciones fueron agitadas mediante ultrasonido para asegurar una correcta homogeneización y la completa disolución de los compuestos en solución.

3.3.3.2. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA

Se empleó un cromatógrafo de gases 4890D (Agilent, Hewlett-Packard) equipado con un detector de ionización de llama (FID). La temperatura del inyector se mantuvo constante a 360 °C. Se utilizó una columna capilar MXT-65TG, de 30 m de largo x 0,25 mm de diámetro interno x 0,1 µm de espesor de película (Restek, Bellefonte, EEUU). Se trata de una columna metálica cuya fase estacionaria es altamente polar (65% difenil/ 35% dimetil polisiloxano). Cabe aclarar que la misma no logra la separación de los diferentes isómeros de posición de los TGs, los cuales son resueltos por grado de insaturación y número de carbonos. La química de su fase estacionaria y la resistencia mecánica que ofrece su estructura metálica le confieren una alta resistencia térmica (370 °C), condición fundamental para el análisis de compuestos de alto peso molecular (Pacheco, 2012).

La temperatura de la columna se mantuvo a 40 °C durante 4 min para luego incrementarse hasta 350 °C a una velocidad de 25 °C/min y luego a 360 °C a 0,2 °C/min. Como gas portador se empleó hidrógeno a una velocidad lineal de 41 cm/s. El volumen inyectado fue de 1 µL. Se utilizó una relación de split de 1:60. La temperatura del detector se mantuvo a 380 °C. La adquisición de datos y la integración se llevó a cabo con el Software HP 3398A GC Chemstation (Hewlett-Packard, 1998). En la **Tabla 3.8** se resume la metodología empleada para la determinación de LNs en muestras de lecitina cruda de girasol nativa e hidrolizada.

Tabla 3.8. Resumen de la metodología implementada para la determinación de lípidos neutros (TGs, DGs, MGs, y AGLs) en la lecitina cruda de girasol y sus muestras hidrolizadas.

Determinación Cromatográfica de Lípidos Neutros - Resumen	
Etapa	Resumen del Método
Liofilización de las muestras	<ul style="list-style-type: none"> -Tomar una alícuota de 2 mL del medio de reacción (aprox. 40 mg de lecitina) -Sumergir en N₂ líq. (10 min) -t = 48 h; T_{cond} = -52 °C; P_{final} = 0,009 mmHg -Resuspender la lecitina liofilizada en 10 mL de cloroformo
Purificación por SPE (cartuchos de fase Diol)	<ul style="list-style-type: none"> -Acondicionar la fase estacionaria con 2 mL de metanol + 2 mL de hexano + 2 mL de cloroformo -Sembrar 0,7 mL de solución de lecitina en cloroformo (aprox. 3-4 mg de lecitina) -Eluir con 2 mL de cloroformo -Eluir con 2 mL de éter etílico -Recoger todo en un vial y se lleva a sequedad.
Derivatización de la muestra	<ul style="list-style-type: none"> -Disolver la muestra purificada en 2 mL de cloroformo, y 1 mL se pasa a vial de derivatización, se lleva a sequedad y se colocan 15 µL de piridina -Agregar 4,5 µL de solución de TD, 4,5 µL de solución TC, 5,2 µL de solución de PoPoPo y 28 µL de MSTFA. Se deja reaccionar (15 min).
Análisis Cromatográfico	<ul style="list-style-type: none"> -Vol de inyección: 1 µL -Inyector: Split/splitless en modo Split (1:60). T_{iny} = 360 °C -Equipo: Agilent 4890D – Detector FID. T_{FID} = 380 °C -Columna capilar metálica MXT-65TG, 30m x 0,25mm x 0,1 µm -Presión en la cabeza de la columna: 12,5 psi -Horno: T = 40 °C durante (4 min) - rampa de 25 °C/min hasta 350 °C - rampa de 0,2 °C/min hasta 360 °C -Gas carrier: H₂ (41 cm/s)

Para la cuantificación, debieron calcularse necesariamente factores de respuesta (RF) para cada uno de los compuestos analizados, ya que la respuesta del detector difería según el compuesto. Estos factores fueron calculados por Pacheco (2012), utilizando el método de múltiples puntos de estándar interno, que consiste en realizar determinaciones a diferentes concentraciones del analito de interés manteniendo constante la correspondiente al estándar interno elegido. De esta forma se construyen curvas de calibración que definen la

relación entre el área del analito y su concentración, ambas referidas al estándar interno. El estándar interno seleccionado para los AGLs fue el tetradecano (TD) y las curvas de calibración se construyeron tomando como ácido graso de referencia al ácido oleico (AO). De esta forma se consideró que todos los AGs presentes en las muestras a analizar poseían igual RF que dicho compuesto. Por otro lado, DGs y MGs se analizaron utilizando tricaprina (TC) como estándar interno (Gutiérrez y col., 2007) y monopalmitina (MP) y dipalmitina (PP) como estándares de referencia para los RFs de MGs y DGs, respectivamente.

En el caso de los TGs no puede utilizarse un único compuesto para la curva de calibración debido a que los factores de respuesta considerando a la tripalmitoleína (PoPoPo) como estándar interno, difieren sustancialmente entre sí. Por ello se utilizaron curvas de calibración para cada uno de los TGs presentes en las muestras. Además, debido a la no disponibilidad de estándares para algunos TGs, se debieron utilizar correlaciones para los factores de respuesta de todos los estándares disponibles para TGs con su tiempo de residencia relativo para permitir la cuantificación de aquellos cuyos estándares no estaban disponibles.

Tanto las mencionadas correlaciones como los factores de respuesta y las curvas de calibración para la cuantificación de los compuestos fueron gentilmente comunicadas por la Dra. Consuelo Pacheco de modo personal para su uso en esta tesis, y tanto la metodología para su obtención, como el desarrollo y validación de la técnica pueden ser consultados en su tesis doctoral (Pacheco, 2012) y/o en la publicación del método correspondiente (Pacheco y col., 2014).

La preparación y acondicionamiento de las muestras y la determinación cromatográfica fueron realizadas por duplicado.

3.3.4. DETERMINACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS Y LISOFOSFOLÍPIDOS POR HPLC-UV

En el capítulo 5 se detalla una revisión de las metodologías más utilizadas para la determinación de PLs y LPLs, y se describe el desarrollo de un método analítico de espectrometría de resonancia magnética nuclear de fósforo para la determinación de PLs y LPLs en las muestras de lecitina cruda de girasol (nativa y modificada). Sin embargo, debido a que recientemente se ha desarrollado una metodología para la determinación de estos compuestos en el grupo (Penci, 2009) y que se cuenta con el equipamiento necesario, en un primer lugar se llevó a cabo el análisis de la composición en PLs y LPLs del sustrato y la lecitina hidrolizada mediante HPLC-UV. Para ello, fue necesario realizar algunas modificaciones en el gradiente de dicha técnica, la cual utiliza como fase móvil un gradiente ternario.

Para la preparación de las muestras se tomaron alícuotas de 2 mL del medio de reacción a diferentes tiempos (0-24 h), se eliminó el contenido de agua por liofilización, y se purificaron mediante el método de SPE con cartuchos de fase diol, según se describe en la sección 3.3.1.3.

La fracción correspondiente a lípidos polares (PLs y PLS) de la purificación, fue colectada en un vial cónico, se llevó a sequedad y se resuspendió en 150 μ L de hexano: isopropanol (50:50).

Se utilizó un cromatógrafo líquido Varian Vista 5000, con una columna de fase normal LiChrosorb Si-60 250 x 4mm, 5 μ m (Merck, Alemania), y un detector Waters PDA (arreglo de fotodiodos) a una longitud de onda (λ) de 206 nm. Como fase móvil se utilizó un gradiente de solventes ternario de A: n-hexano, B: 2-propanol/ácido acético 99,75/0,25 v/v y C:

metanol/agua HPLC 97/3 v/v. En la **Tabla 3.9** se muestra la programación de la fase móvil utilizada en esta tesis para la determinación de PLs y LPLs mediante HPLC-UV.

Tabla 3.9. Programación de la fase móvil utilizada en la determinación de PL y LPL mediante HPLC-UV (Modificación de programación propuesta por Penci, 2009).

Programación de la Fase Móvil					
Tiempo (min)	Solvente A (% v/v)	Solvente B (% v/v)	Solvente C (% v/v)	Caudal (mL/min)	Presión (atm)
0	70	17	13	1,0	50
1	70	17	13	1,0	52
3	63	17	20	1,0	54
8	57	17	26	1,5	56
11	30	17	53	1,5	66
15	0	17	83	1,5	81
26	0	17	83	1,0	80
30	50	17	33	1,0	74
32	70	17	13	1,0	60

Todos los solventes utilizados fueron grado HPLC. El volumen de inyección fue de 10 μ L y la determinación se realizó a temperatura ambiente (20-25 °C). El procesamiento de datos se llevó a cabo mediante el Software Empower 2, y la cuantificación de los compuestos se realizó por el método del estándar externo. Para ello se realizaron curvas de calibración preparando soluciones estándares para cada uno de los compuestos presentes en las

muestras de lecitina de girasol. La preparación y cuantificación de las muestras se realizaron por duplicado.

En la **Tabla 3.10** se detalla un resumen de la metodología utilizada para la determinación de PLs y LPLs por HPLC-UV.

Tabla 3.10. Resumen de la metodología implementada para la determinación de fosfolípidos y lisofosfolípidos en la lecitina cruda de girasol y sus muestras hidrolizadas mediante HPLC-UV.

Determinación de PLs y LPLs por HPLC-UV - Resumen	
Etapa	Resumen del Método
Liofilización de las muestras	<ul style="list-style-type: none"> -Tomar una alícuota de 2 mL del medio de reacción (aprox. 40 mg de lecitina) -Sumergir en N₂ líq. (10 min) -t = 48 h; T_{cond} = -52 °C; P_{final} = 0,009 mmHg -Resuspender la lecitina liofilizada en 10 mL de cloroformo
Purificación por SPE (cartuchos de fase Diol)	<ul style="list-style-type: none"> -Acondicionar de la fase estacionaria con 2 mL de metanol + 2 mL de hexano + 2 mL de cloroformo -Sembrar 0,7 mL de solución de lecitina en cloroformo (aprox. 3-4 mg de lecitina) -Eluir con 2 mL de cloroformo -Eluir con 2 mL de éter etílico -Eluir con 7 mL de metanol:amoníaco -Recoger la última fracción, se lleva a sequedad y se resuspende en 150 µL de hexano: isopropanol).
Análisis Cromatográfico	<ul style="list-style-type: none"> -Volumen de inyección: 10 µL -Equipo: Varian Vista 5500 – Detector Water PDA. T = amb. -Columna de fase normal LiChrosorb Si-60 250 x 4mm, 5µm -Fase móvil: gradiente ternario (ver Tabla 3.9)

3.4. BIBLIOGRAFÍA

- AOCS. (2003).** *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*. AOCS Press, Champaign.
- Carelli, A. A., Bredan, M. I. V., & Crapiste, G. H. (1997).** Quantitative determination of phospholipids in sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(5), 511–514.
- Dole, V. P., & Meinertz, H. (1960).** Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 235, 2595–2599.
- Gutiérrez, C., Carelli, A. A., & Ferreira, L. (2007).** Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 35–43.
- Hettinga, D. (2005).** Capítulo 1: Butter. En *Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Vol 2. Edible Oil and Fat Products: Edible Oils* (6° ed., pp. 1–59). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- IUPAC. (1992).** *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivates. International Union of Pure and Applied Chemistry* (7th ed.). Blackwell Scientific Publications, Inc., Oxford.
- Lio, Y., & Dennis, E. A. (1998).** Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of Group VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1392, 320–332.
- Madoery, R., Gattone, C. G., & Fidelio, G. (1995).** Bioconversion of phospholipids by immobilized phospholipase A₂. *Journal of Biotechnology*, 40, 145–153.
- Maroto, B., & Camuso, C. (2000).** Inmovilización de fosfolipasa A₂. *Grasas Y Aceites*, 51(3), 150–156.
- Pacheco, C. (2012).** *Cinética de la Interesterificación Enzimática de Aceites Vegetales*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur. Argentina.

- Pacheco, C., Palla, C., Crapiste, G. H., & Carrín, M. E. (2014).** Simultaneous quantitation of FFA, MAG, DAG, and TAG in enzymatically modified vegetable oils and fats. *Food Analytical Methods*, 7(10), 2013-2022.
- Penci, M. C. (2009).** *Modificación Enzimática de Lecitinas*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur, Argentina.
- Penci, M. C., Constenla, D. T., & Carelli, A. A. (2010).** Free-fatty acid profile obtained by enzymatic solvent-free hydrolysis of sunflower and soybean lecithins. *Food Chemistry*, 120(1), 332–338.
- Plank, C., & Lorbeer, E. of C. A. (1995).** Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 697, 461–468.
- Wendel, A. (2000).** Lecithin. En *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.

CAPÍTULO IV:

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

En el capítulo 1 se mostró una revisión bibliográfica de las diferentes metodologías utilizadas en la modificación de lecitinas, en especial del uso de la tecnología enzimática. En este capítulo se describe la hidrólisis de lecitina cruda de girasol utilizando la enzima Lecitase® Ultra como catalizador. El análisis comienza con un estudio de la influencia del medio de reacción, determinando las condiciones óptimas o recomendables para este tipo de aplicación de la hidrólisis. Así mismo, se presentan los resultados de la determinación analítica de los productos secundarios de hidrólisis como los ácidos grasos y las formas hidrolizadas de los triglicéridos. Al final de este capítulo se describe la determinación analítica de fosfolípidos y sus formas hidrolizadas mediante HPLC-UV. Debido a que, como se explica luego, esta técnica no permitió la cuantificación e identificación de todos los compuestos en este tipo de muestras, se desarrolló una técnica analítica para su determinación por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de fósforo (capítulo 5), y los resultados para la determinación de PLs y LPLs mediante esta técnica desarrollada se muestran en el capítulo 6.

4.1. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE REACCIÓN

4.1.1. SISTEMA DE REACCIÓN

El esquema del sistema de reacción utilizado se muestra en la **Figura 4.1**. La hidrólisis se llevó a cabo en tubos cerrados, sumergidos en un baño calefactor con control de temperatura para asegurar que el medio de reacción se mantenga a temperatura constante. El recipiente contenedor de los tubos de reacción, contiene el fluido calefactor (agua), que es recirculado por el baño mediante mangueras de goma, y se sitúa sobre un equipo agitador magnético con 6 posiciones de agitación (AM06-froggy6, Semedic SRL, Argentina).

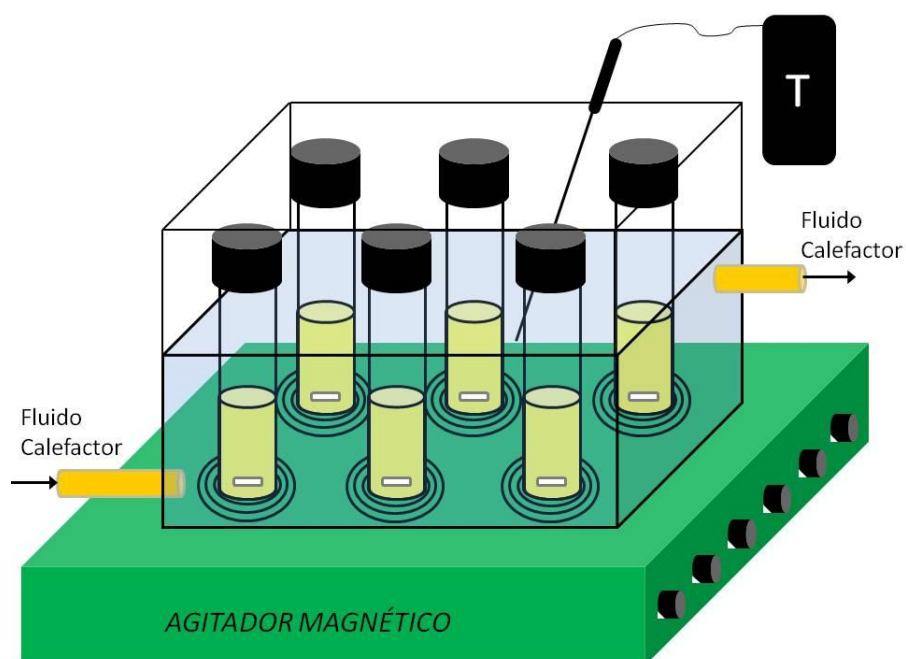


Figura 4.1. Esquema del sistema de reacción.

El agitador se calibró en los laboratorios de la unidad de administración territorial del CCT-Bahía Blanca, permitiendo conocer con exactitud la velocidad de agitación correspondiente a cada punto del equipo. Para las reacciones de hidrólisis realizadas en esta tesis se utilizó el punto 2 para todos los casos, correspondiente a una velocidad media de agitación de 257 rpm, con un coeficiente de variación según la posición utilizada de 2%.

Si bien las características químicas, el comportamiento y las distintas conformaciones que adoptan los fosfolípidos en medios acuosos ya ha sido discutida en el capítulo 1, es conveniente aclarar en este punto algunos aspectos:

En agua, las moléculas de fosfolípidos generalmente forman vesículas multilamelares (MLV), que pueden convertirse en unilamelares (ULV) por acción de tratamientos como el sonicatedo (Wendel, 2000). Asimismo, Robertson y col. (2004) han reportado la presencia de MLV en la caracterización de dispersiones de fosfolípidos en agua mediante crio-fracturas y posterior análisis por TEM (Transmission Electron Microscopy). Estas estructuras multilamelares se ven reflejadas en la turbidez del sistema de reacción, y dan como resultado muestras opacas de color amarillo.

La agitación a la que se somete el medio de reacción durante la hidrólisis podría alterar el tamaño de las vesículas de fosfolípidos ya sea por fusión o por partición, pudiendo causar una modificación en la disponibilidad de estos sustratos para la hidrólisis (Penci, 2009).

Por ello, se evaluó la influencia de la agitación determinando la distribución del tamaño de partícula del medio de reacción sin agitar ($t = 0$) y luego de someter el sistema a agitación durante 60 y 360 min, sin el agregado de enzima. Para la determinación de la distribución del tamaño de partícula se utilizó un equipo Mastersizer S longbed (versión 2.15, Malvern

Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido). En la **Figura 4.2** se muestra la distribución de tamaño de partícula en volumen (ver capítulo 2, Ec. 2.2).

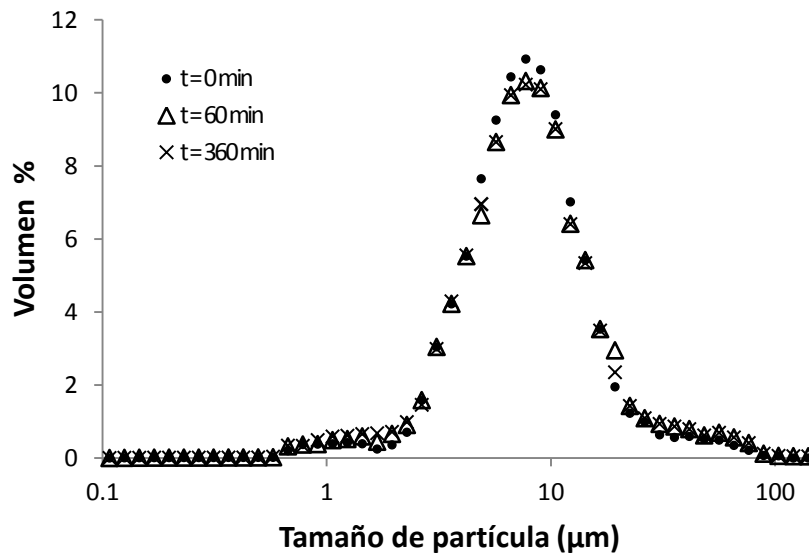


Figura 4.2. Distribución del tamaño de partícula para el medio de reacción según el tiempo de agitación (Sin enzima).

Como puede verse, la distribución obtenida no presenta variación apreciable entre la muestra sin agitar y con 60 y 360 min de agitación. Luego, estos resultados sugieren que en las condiciones establecidas en este trabajo, el tiempo de agitación no altera el tamaño de las vesículas de fosfolípidos disponibles para la hidrólisis.

4.1.2. CONDICIONES ÓPTIMAS DE REACCIÓN

Como al inicio de esta tesis no se encontró en la literatura información suficiente acerca de las condiciones óptimas para maximizar la actividad enzimática de Lecitase® Ultra en la

hidrólisis de lecitinas crudas, fue necesario el estudio de las condiciones óptimas de reacción. Cabe aclarar que durante el desarrollo de esta tesis, algunos autores reportaron estudios acerca de esto, que se utilizaron para comparar y validar los resultados obtenidos.

En las reacciones enzimáticas que involucran lipasas y fosfolipasas, es muy común el uso de iones metálicos como cofactores. El efecto que causan en la actividad de ciertas enzimas a través de diversos mecanismos ha sido ampliamente estudiado. Varios autores han reportado que la presencia de iones Ca^{2+} juega un rol importante en la acción catalítica de varias fosfolipasas, consideradas calcio-dependientes (Dennis, 1994; Schaloske & Dennis, 2006). Algunos autores han sugerido la dependencia de la enzima Lecitase® Ultra a la presencia de iones Ca^{2+} en su actividad como lipasa y fosfolipasa (Mishra y col., 2009; Zhang y col., 2012), por lo que la presencia de estos iones en el medio de reacción se consideró como parámetro para el estudio de las condiciones óptimas de la hidrólisis.

Con respecto al pH óptimo de la reacción, los resultados reportados por Penci (2009) sugieren una mayor actividad de la enzima sobre fosfatidilcolina a pH=7 y sobre fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina a pH=8. Sin embargo, otros autores sugieren que la mayor actividad como fosfolipasa de la enzima Lecitase® Ultra se tiene en medio ácido, con un valor de pH=5 (Yang y col., 2006; Yu y col., 2013). Por lo tanto, el pH del medio de reacción fue otro parámetro considerado para su estudio en el análisis de las condiciones óptimas para la hidrólisis.

Además se estudió la influencia del agregado de solventes orgánicos (hexano) en el medio de reacción, debido a que la presencia de estos solventes podría favorecer la interacción entre la enzima y el sustrato

Para la hidrólisis enzimática de lecitina cruda de girasol con Lecitase® Ultra, se eligió utilizar una relación enzima: sustrato de 1 µL: 80 mg, según experiencia previa en el grupo de investigación de Ingeniería de Alimentos de PLAPIQUI.

4.1.2.1. MEDIO DE REACCIÓN

En un primer estudio, se utilizó un sistema de 3 variables (pH; contenido de Ca^{2+} ; y presencia de solvente), manteniendo la temperatura y el tiempo de reacción constantes en 50 °C y 1 h respectivamente. El diseño experimental utilizado para el estudio de todas las variables en paralelo se muestra en la **Tabla 4.1**.

Para mantener el pH constante las reacciones se llevaron a cabo en soluciones buffer de acetato y Tris para pH 5 y 8 respectivamente (preparadas de acuerdo a lo descrito en el capítulo 3, sección 3.1.3.3)

El contenido de iones Ca^{2+} en el medio de reacción fue de 0 (-) y 0,24 mg/ mL (+), utilizándose CaCl_2 para tal fin.

La concentración tanto de enzima como de lecitina en el medio de reacción se mantuvo constante para todos los ensayos (solución buffer: lecitina: enzima en una relación de 4 mL: 80 mg: 1 µL).

El solvente orgánico utilizado fue hexano (grado analítico, Dorwill), en una proporción en el medio de reacción de 0,6 (v/v).

La cantidad utilizada de solvente orgánico y calcio se eligió según estudios previos en el grupo de investigación (Gutiérrez y col., 2007; Penci, 2009).

El grado de hidrólisis se midió a través de la cuantificación de los ácidos grasos liberados mediante titulometría con hidróxido de potasio 0,1 N, según se describe en el capítulo 3 (sección 3.3.2.1). La reacción de hidrólisis y la titulación de los AGLs fueron realizadas por duplicado, lo que da un total de 4 muestras para cada conjunto de condiciones de reacción estudiado. Los valores promedios calculados para cada experimento se compararon mediante un test de Student (*t*-test), y las diferencias se consideraron significativas para valores de $P < 0,05$.

En la **Tabla 4.1** se muestran los resultados obtenidos en la titulación de AGLs para las distintas condiciones de reacción estudiadas.

Tabla 4.1. Ácidos grasos liberados luego de 1 h de reacción para cada conjunto de variables estudiado.

<i>Experimento</i>	<i>Variable</i>			<i>AGL Titulados*</i> (mmol/ g lecitina)
	<i>pH</i>	<i>Ca²⁺</i>	<i>Hexano</i>	
1	5	+	+	0,32 ± 0,03 ^{b,c}
2	5	+	-	0,66 ± 0,06 ^e
3	5	-	+	0,30 ± 0,02 ^b
4	5	-	-	0,62 ± 0,05 ^e
5	8	+	+	0,24 ± 0,01 ^a
6	8	+	-	0,45 ± 0,03 ^d
7	8	-	+	0,23 ± 0,03 ^a
8	8	-	-	0,40 ± 0,04 ^{c,d}

* Media aritmética ± Desviación estándar; n = 4.

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas, con un 95% de confianza ($P < 0,05$); "a" corresponde al menor valor y "e" al mayor.

Puede observarse que la mayor cantidad de ácidos grasos liberados durante la hidrólisis se obtuvo con el medio de reacción libre de solvente (experimentos 2, 4, 6 y 8). Por otra parte las muestras de lecitina hidrolizada a pH=5 presentaron mayores valores de AGLs que a pH=8.

Por último puede verse que en los ensayos con mayor liberación de AGs, (experimentos 2, y 4) el agregado de iones Ca^{2+} no mejora significativamente el grado de hidrólisis, ya que se obtuvieron valores estadísticamente iguales para ambos ensayos.

Estos resultados pueden apreciarse de manera gráfica en la **Figura 4.3**.

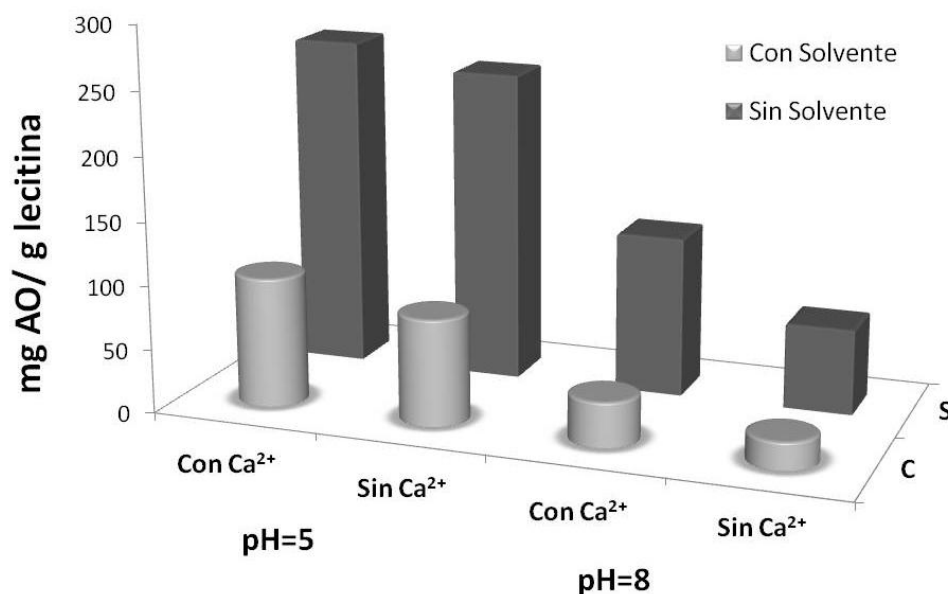


Figura 4.3. Liberación de ácidos grasos luego de 1 h de hidrólisis, para diferentes condiciones de reacción. pH=5 y 8; con y sin el agregado de calcio y/o solvente (hexano) en el medio de reacción.

De este estudio se desprende que las condiciones del medio de reacción recomendables para la hidrólisis de lecitina cruda de girasol utilizando Lecitase® Ultra como catalizador, son a pH=5 y en medio acuoso, sin presencia de solvente orgánico. Con respecto a la influencia del Ca^{2+} , si bien se obtuvo un valor promedio de AGLs más alto para la reacción en presencia de este ion, el análisis estadístico indica que esta diferencia no es significativa, por lo que no se justifica su uso en el medio de reacción para la hidrólisis. Además la presencia de iones divalentes en el medio de hidrólisis causaría luego una desmejora en la resolución de picos mediante la determinación por P-NMR, originando picos más anchos, dificultando así su identificación y cuantificación (ver capítulo 5).

Los resultados encontrados para el efecto del pH y el agregado de solvente orgánico concuerdan con lo informado por Yang y col. (2006), Liu y col. (2011) y Zhang y col. (2012).

4.1.2.2. TEMPERATURA DE REACCIÓN

La temperatura produce cambios en la conformación y estabilidad de las enzimas, por lo que afecta su actividad. Por ello, una vez especificadas las condiciones del medio de reacción, se llevó a cabo un estudio de la influencia de la temperatura en el grado de hidrólisis, y el avance de la reacción a través del tiempo. Según lo encontrado en la literatura se decidió estudiar dos temperaturas diferentes: 50 y 60 °C. Para ambos casos la reacción fue llevada a cabo a distintos tiempos (entre 1 y 24 h). Todas las reacciones de hidrólisis se realizaron a pH=5, en medio acuoso (buffer de acetato), sin el agregado de iones Ca^{2+} .

El grado de hidrólisis se midió a través de la cuantificación de los ácidos grasos liberados mediante titulometría con hidróxido de potasio 0,1 N, según se describe en el capítulo 3, (sección 3.3.2.1).

La reacción y la titulación de los AGLs fueron realizadas por duplicado, lo que da un total de 4 muestras para cada tiempo de reacción estudiado.

Los resultados, cantidad de AGs liberados en mmol/g de lecitina en función del tiempo de hidrólisis (t_h) se muestran en la **Figura 4.4**, observándose una gran diferencia entre las dos temperaturas estudiadas, siendo la cantidad de AGs liberados mucho menor cuando la reacción se realiza a 60 °C.

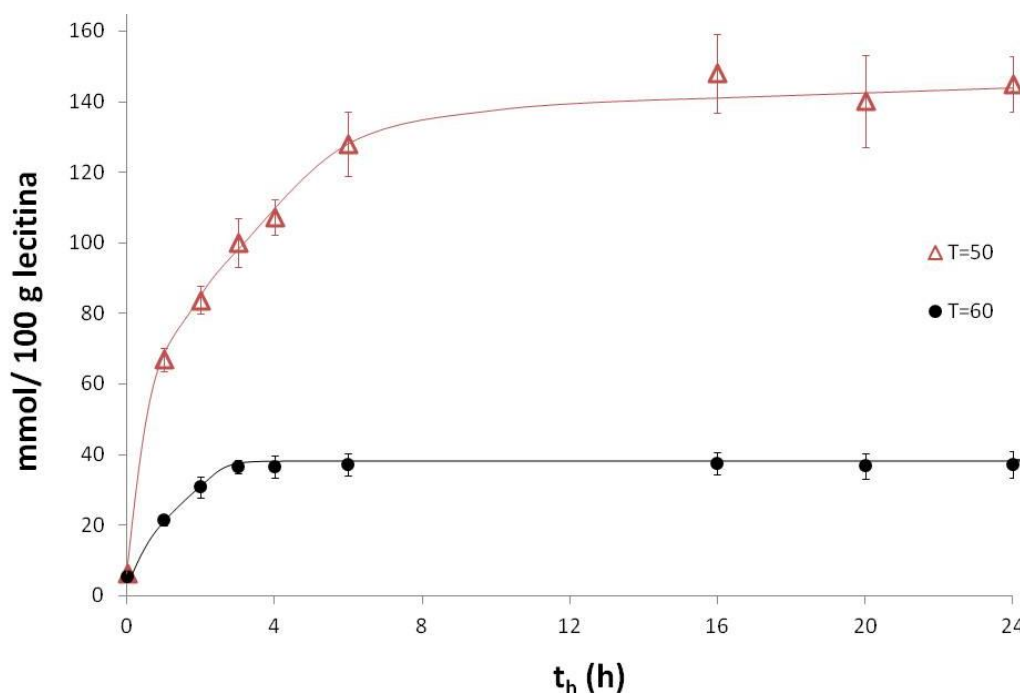


Figura 4.4. Curva de liberación de ácidos grasos durante la hidrólisis de lecitina cruda de girasol con Lecitase® Ultra, para dos temperaturas de reacción diferentes, $T=50$ °C y $T=60$ °C. (media aritmética y desviación estándar, con $n = 4$).

Puede verse que con una temperatura de 50 °C no sólo se tiene una velocidad inicial mucho mayor con respecto a la obtenida a 60 °C, sino que se obtiene una mayor cantidad total de AGs liberados a lo largo de toda la hidrólisis. Esto indica que a $T = 50$ °C se tienen mayores

niveles de conversión o grado de hidrólisis. Esto concuerda con lo reportado por varios autores (Zhang y col., 2012; Yu y col., 2013).

A pesar de diferir en cuanto a la influencia de los iones Ca^{2+} en la actividad como fosfolipasa de la enzima, lo reportado por Zhang y col. (2012) concuerda con los resultados obtenidos en esta tesis, en que dentro de las condiciones estudiadas, la mayor conversión de fosfolípidos a lisofosfolípidos se obtiene utilizando un medio de reacción acuoso, y una temperatura de 50 °C.

4.2. SEGUIMIENTO DE LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS

Las reacciones de hidrólisis a distintos tiempos se llevaron a cabo utilizando las condiciones recomendadas en la sección 4.1, utilizando un medio acuoso libre de solvente, a pH=5 y con una temperatura de reacción de 50 °C. Para detener la reacción a distintos tiempos, las muestras fueron incubadas a 100 °C durante 10 minutos para inactivar la enzima. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo por duplicado. Las muestras de reacción que no fueron usadas en el momento para alguna de las determinaciones, se conservaron en freezer a -18 °C hasta su utilización.

A continuación se describe la determinación de la composición de sustratos y productos de hidrólisis, en la lecitina cruda nativa de girasol, y sus muestras modificadas a distintos tiempos de reacción.

4.2.1. ÁCIDOS GRASOS

4.2.1.1. CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS PRESENTES EN EL SUSTRATO

Para conocer el tipo y cantidad de ácidos grasos totales presentes en el sustrato utilizado para la hidrólisis, se determinó el contenido de los mismos en la lecitina cruda de girasol. Se realizó además una purificación para separar la fracción de aceite (triglicéridos) en la lecitina cruda de la fracción de los fosfolípidos, de manera de determinar el contenido de AGs en ambas fracciones por separado. Para la separación de las fracciones se realizó una purificación por extracción en fase sólida (SPE; ver sección 3.3.1.3). La identificación y cuantificación de las mismas se llevó a cabo por cromatografía gaseosa capilar cuya metodología fue descrita en el capítulo 3 (sección 3.3.2.2).

En la **Tabla 4.2** se muestra la composición total de los ácidos grasos presentes en la lecitina cruda nativa (sin hidrolizar). Esta composición incluye los ácidos grasos libres y unidos tanto a las moléculas de fosfolípidos (y lisofosfolípidos) como a las de triglicéridos (TGs) y otros lípidos neutros como los diglicéridos y monoglicéridos (DGs y MGs).

Puede verse que el contenido de AGs en la lecitina cruda y sus dos fracciones purificadas es similar. En todos los casos, los AGs mayoritarios son el ácido linoleico (L; C18:2), seguido del ácido oleico (O; C18:1), ambos AGs insaturados. A estos, le siguen el ácido palmítico (P; C16:0) y el esteárico (S; C18:0), ambos saturados. El resto de los AGs presentes, se encuentran en un contenido menor al 1%. Al comparar las distintas fracciones, puede observarse que el contenido de ácido linoleico es mayor en la fracción de fosfolípidos que en la de triglicéridos (aceite).

Tabla 4.2. Composición de ácidos grasos (% m/m) de lecitina cruda de girasol.

Ácido Graso	Composición de Ácidos Grasos (%) ^{a,b} según la Fracción Analizada		
	Lecitina Cruda	Fracción Fosfolípidos	Fracción Aceite
C14:0	0,09 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,00
C16:0	12,38 ± 0,02	11,50 ± 0,18	12,47 ± 0,04
C16:1	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,00
C17:0	0,12 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,12 ± 0,00
C17:1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C18:0	4,10 ± 0,02	3,52 ± 0,02	4,24 ± 0,02
C18:1	16,80 ± 0,05	15,49 ± 0,09	17,12 ± 0,03
C18:2	64,67 ± 0,07	67,52 ± 0,14	64,12 ± 0,07
C18:3	0,29 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,29 ± 0,01
C20:0	0,18 ± 0,01	0,28 ± 0,03	0,15 ± 0,00
C20:1	0,10 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,11 ± 0,01
C22:0	0,90 ± 0,01	0,76 ± 0,05	0,92 ± 0,01
C24:0	0,27 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,27 ± 0,01

^a Porcentaje m/m sobre el total de ácidos grasos.

^b Media aritmética ± Desviación estándar; n = 3.

Esto puede explicarse por la posición en la que se encuentra normalmente ubicado este AG en la molécula. En los aceites vegetales, los AGs saturados se encuentran principalmente en las posiciones extremas (*sn*-1 y *sn*-3) de las moléculas de TGs y PLs y los poliinsaturados en la posición central (*sn*-2) (Carelli y col., 2002). Los PLs, al no contener AGs en la posición *sn*-3 (donde se encuentra el grupo fosfato y el sustituyente), presentan una mayor relación de poliinsaturados/saturados, lo cual explica que la fracción de PLs resulte más rica en ácido linoleico, que contiene dos insaturaciones.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura para aceite y lecitina de girasol (Hollo y col., 1993; Carelli y col., 2002; Dijkstra, 2011; Guiotto, 2014).

4.2.1.2. SEGUIMIENTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS LIBERADOS POR HIDRÓLISIS

La determinación cuali-cuantitativa de los AGs liberados durante la hidrólisis se llevó a cabo por cromatografía gaseosa capilar, previa extracción y metilación, según se describe en el capítulo 3 (sección 3.3.2.2).

La hidrólisis se efectuó a distintos tiempos (t_h) entre 0,5 y 24 h, y tanto la reacción como la inyección en el cromatógrafo fueron realizadas por duplicado, lo que resultó en un total de 4 muestras por cada tiempo de reacción analizado. Se utilizó el test de Student (t -test) como método de comparación de medias. Las diferencias entre los valores obtenidos para los distintos tiempos de reacción (t_h) se consideraron significativas para valores de $P < 0,05$.

En la **Tabla 4.3** se muestra la composición de los ácidos grasos libres presentes en la lecitina cruda nativa y modificada, a distintos tiempos de reacción.

Puede verse que a tiempos cortos de reacción ($t_h \leq 1$ h) el ácido palmítico (P) sufre un brusco aumento en el medio de reacción, y luego de 4 h su concentración permanece constante. Esto indicaría que el ataque de la enzima a los enlaces donde se encuentra P ocurre en mayor medida durante la primera hora de reacción.

Tabla 4.3. Composición de los principales ácidos grasos libres en la lecitina cruda de girasol nativa ($t_h = 0$) y modificada a distintos grados de hidrólisis. Se muestra la composición para los ácidos palmítico (P), esteárico (S), oleico (O) y linoleico (L).

t (h)	Ácido Graso (g/ 100 g lecitina)*			
	P	S	O	L
0	0,26 ± 0,02 ^a	0,32 ± 0,02 ^a	0,64 ± 0,04 ^a	0,20 ± 0,02 ^a
1	7,70 ± 0,31 ^b	0,68 ± 0,04 ^b	2,69 ± 0,11 ^b	3,24 ± 0,12 ^b
2	8,97 ± 0,39 ^c	0,68 ± 0,03 ^b	2,90 ± 0,13 ^{b,c}	5,44 ± 0,31 ^c
3	9,72 ± 0,32 ^d	0,69 ± 0,03 ^b	2,96 ± 0,09 ^c	9,52 ± 0,38 ^d
4	10,57 ± 0,41 ^e	0,75 ± 0,04 ^b	3,26 ± 0,12 ^d	14,61 ± 0,51 ^e
6	10,86 ± 0,39 ^e	0,74 ± 0,03 ^b	3,93 ± 0,09 ^e	17,68 ± 0,72 ^f
16	10,93 ± 0,40 ^e	0,93 ± 0,03 ^c	4,42 ± 0,11 ^f	20,64 ± 0,90 ^g
24	10,72 ± 0,41 ^e	0,90 ± 0,02 ^c	4,46 ± 0,10 ^f	20,79 ± 1,09 ^g

* Media aritmética ± Desviación estándar; n = 4.

Letras iguales en una misma columna indican que no existen diferencias significativas al 95% de confianza ("a" corresponde al menor valor y "g" al mayor).

Por otra parte la lecitina modificada no presentó un aumento importante en el contenido de ácido esteárico (S). Si bien el contenido de S en el sustrato es pequeño, la relación de este AG con el resto de los AGs mayoritarios es mucho mayor en el sustrato que la observada en los AGs liberados. Por ejemplo, mientras que en el sustrato la relación S/P es cercana a 1/3, en los AGLs se tiene una relación de 1/14. Esto sugiere que la enzima no tiene preferencia por hidrolizar al S.

Con respecto a los AGs insaturados, se observa que la concentración de ácido oleico (O) presentó un incremento suave pero constante a lo largo de toda la reacción. La concentración de ácido linoleico, AG mayoritario en el sustrato, presenta un suave aumento

a tiempos cortos de reacción ($t_h \leq 1h$), y a medida que la reacción avanza su liberación comienza a aumentar considerablemente.

Asimismo, en la **Figura 4.5** se muestra el perfil de ácidos grasos liberados en la lecitina cruda de girasol y las muestras hidrolizadas. En esta figura se muestra la diferencia del contenido de cada AGL determinado con respecto a su composición original. Por ello es más fácil observar que a tiempos cortos ($t_h \leq 1 h$), se libera casi todo el ácido palmítico, y luego a medida que la reacción avanza el ácido linoleico liberado se incrementa notablemente.

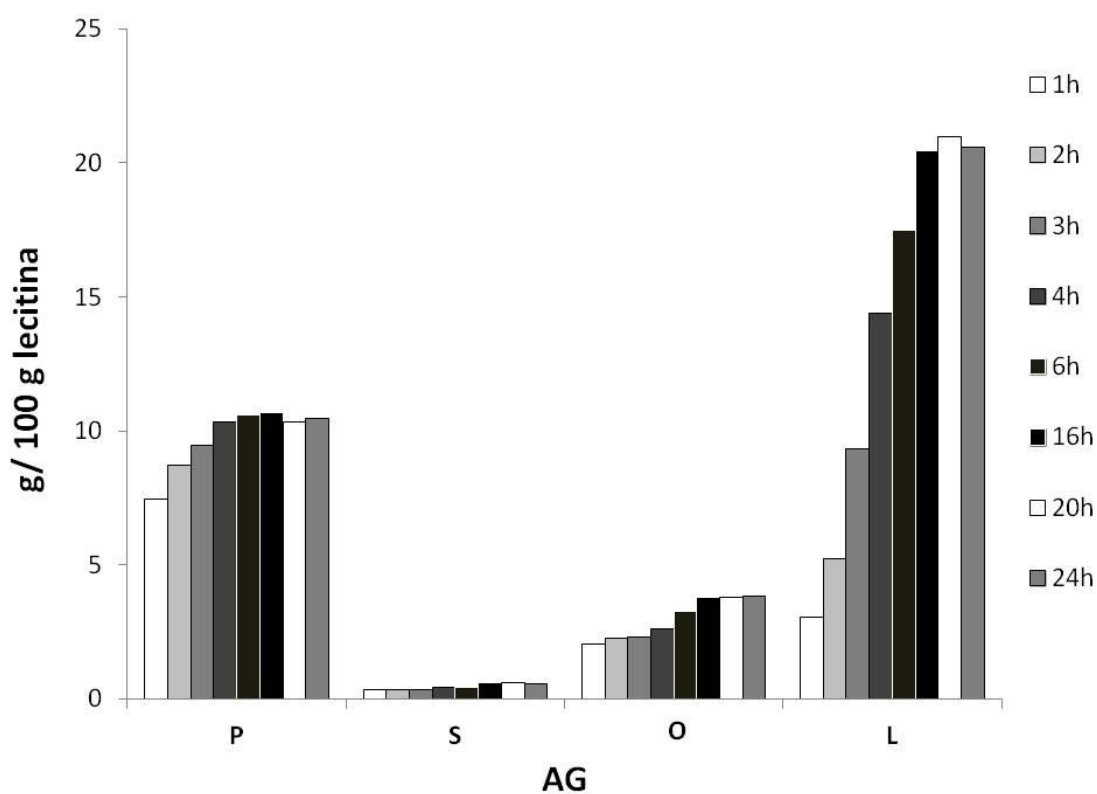


Figura 4.5. Perfil de ácidos grasos liberados en la hidrólisis de lecitina cruda de girasol a distintos tiempos de reacción. Se muestra la composición para los ácidos palmítico (P), esteárico (S), oleico (O) y linoleico (L).

Además, si se tiene en cuenta lo explicado anteriormente acerca de las posiciones en las que se encuentran los AGs, y recordando que la enzima es específica de la posición *sn*-1 de los PLs (además de la *sn*-3 en los TGs), resulta lógico que los ácidos grasos saturados (mayormente ubicados en la posición *sn*-1 y *sn*-3 de TGs y *sn*-1 de PLs) sean liberados en mayor medida en la hidrólisis con Lecitase® Ultra. Por lo tanto comparando los resultados obtenidos para los AGs saturados (P y S) puede decirse que la enzima tiene preferencia por hidrolizar el P frente al S, ya que si bien ambos se encuentran en la misma posición el P es liberado en mucha mayor proporción. Por otro lado, la liberación del ácido linoleico observada sugiere la ocurrencia de la migración desde la posición *sn*-2 donde se encuentra mayoritariamente el L, a la posición *sn*-1 donde puede ser atacado por la enzima. Esto podría explicar la liberación de L a tiempos más largos de reacción, en contraste con el P que lo hace a tiempos cortos.

Esto sugiere que en el medio de reacción tiene lugar la reacción no enzimática de migración de ácidos grasos, que discutiremos más adelante con mayor profundidad.

4.2.2. LÍPIDOS NEUTROS

Como ya se explicó, los lípidos neutros comprenden la fracción no polar de la lecitina cruda, compuesta por restos de aceite que permanece junto con las gomas en el proceso de desgomado. Esta fracción está compuesta por triglicéridos (TGs), y puede encontrarse en menor medida algo de diglicéridos (DGs) y monoglicéridos (MGs). Si bien los TGs no presentan interés desde el punto de vista de la utilización del producto como emulsionante, sus productos de hidrólisis (DGs y MGs) son ampliamente utilizados en la industria de

alimentos y cosmética por sus conocidas propiedades surfactantes (Artz, 1990; Whitehurst, 2004; Brummer, 2006; Hasenhuettl, 2008).

Si bien la enzima Lecitase® Ultra es una fosfolipasa, su actividad lipásica ha sido reportada por varios autores (Yang y col., 2006; Mishra y col., 2009; Wang y col., 2009), sugiriendo que los triglicéridos presentes en la muestra de lecitina cruda nativa pueden ser atacados por la enzima e hidrolizados a mono y diglicéridos, obteniendo lecitinas modificadas no sólo en su composición de fosfolípidos y ácidos grasos libres, sino también en la composición de sus lípidos neutros.

Para verificar esto, se determinó la composición de TGs, DGs, y MGs en la lecitina cruda nativa de girasol y en las muestras hidrolizadas a distintos tiempos de reacción (30-360 min).

La determinación se llevó a cabo por una técnica cromatográfica desarrollada por miembros del grupo de investigación (Pacheco y col., 2014), detallada en el capítulo 3 (sección 3.3.3).

Tanto la reacción de hidrólisis como la inyección en el cromatógrafo se realizaron por duplicado, lo que resultó en un total de 4 muestras para cada tiempo de reacción analizado.

La nomenclatura utilizada para las distintas especies de monoglicéridos y diglicéridos, según los ácidos grasos que contienen (R_1 , R_2 , etc.) y su posición en la molécula, se muestra en la **Figura 4.6**. Cabe destacar que la técnica no permite distinguir entre los isómeros 1,2- y 2,3 de los DGs.

Monoglicéridos		Diglicéridos	
$\begin{array}{l} \text{OCOR}_1 \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{OH} \\ \\ \text{OCOR}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{OH} \\ \\ \text{OCOR}_2 \\ \\ \text{OCOR}_3 \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{OCOR}_1 \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{OCOR}_3 \end{array}$
$1 - MR_1$	$2 - MR_2$	$1,2 (2,3) - R_2R_3$	$1,3 - R_1R_3$

Figura 4.6. Nomenclatura utilizada para monoglicéridos y diglicéridos, según la posición y el tipo de AG (R_i).

En las **Figuras 4.7 y 4.8** se muestran ejemplos de cromatogramas correspondientes a la lecitina sin modificar (A) y modificada luego de 60 min de reacción (B).

La **Figura 4.7** muestra la zona del cromatograma correspondiente a los MGs. Puede verse cómo el área correspondiente a todas las especies aumenta considerablemente en la lecitina modificada (Figura 4.7 B), con respecto a lo observado para el sustrato (Figura 4.7 A).

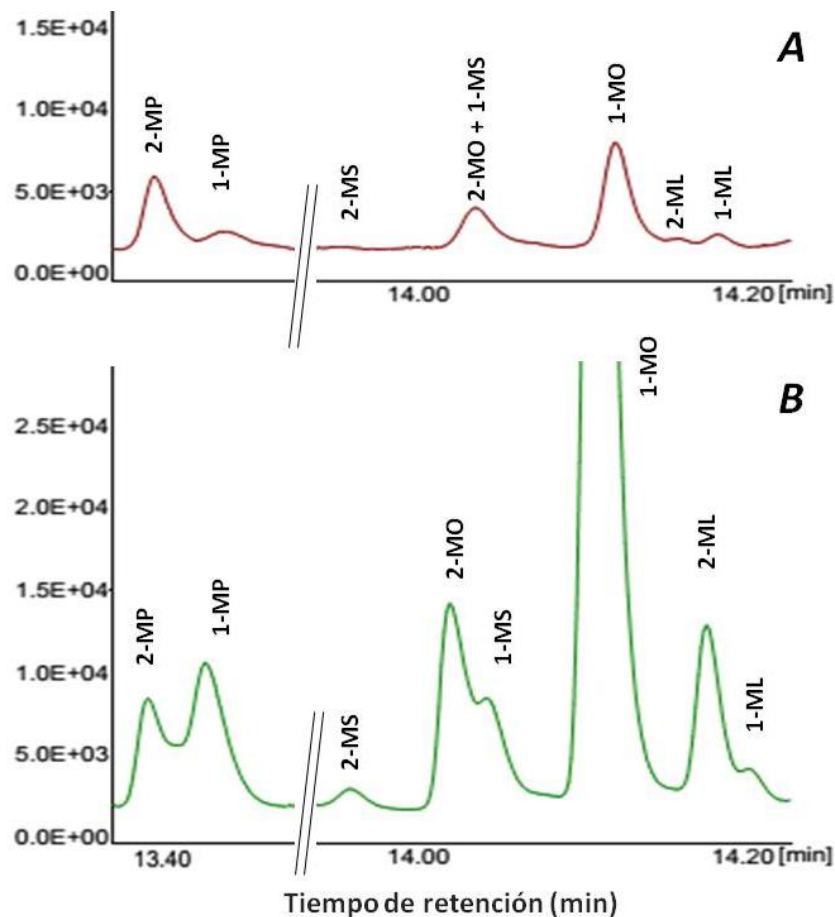


Figura 4.7. Cromatogramas de muestras de lecitina cruda nativa **(A)** y modificada luego de 60 min de reacción **(B)**. Se muestra la zona correspondiente a los picos de monoglicéridos **(MGs)**.

De manera similar, la **Figura 4.8** muestra la zona del cromatograma correspondiente a los diglicéridos (DGs). En este caso, también se observa un aumento en el área correspondiente a las distintas especies de DGs en las muestras de lecitina modificada por hidrólisis (Figura 4.8 B).

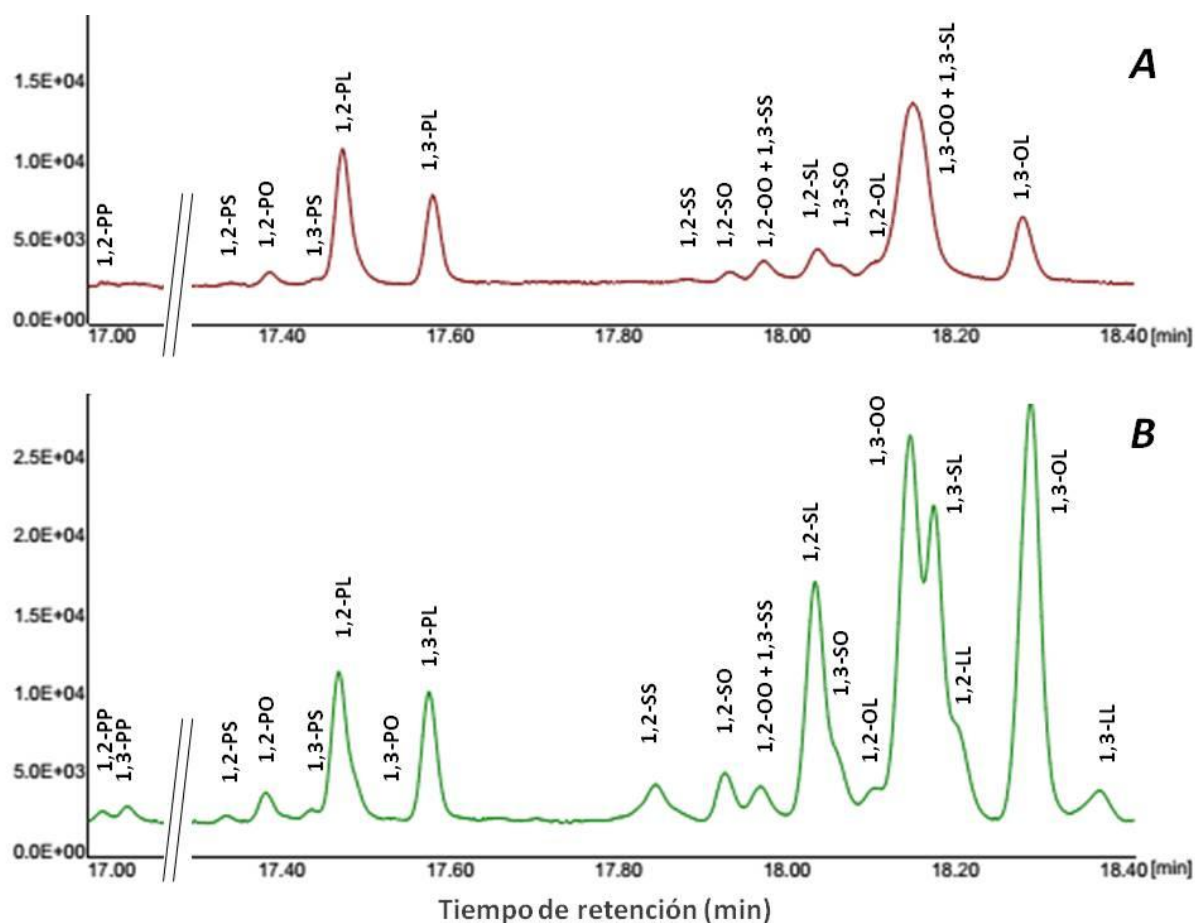


Figura 4.8. Cromatogramas de muestras de lecitina cruda nativa **(A)** y modificada luego de 60 min de reacción **(B)**. Se muestra la zona correspondiente a los picos de diglicéridos **(DGs)**.

En la **Tabla 4.4** se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de lípidos neutros, expresados en g/ 100 g lecitina, para distintos tiempos de hidrólisis (t_h).

Al igual que para la determinación de AGs, se utilizó el test de Student (t -test) como método de comparación de medias. Para todos los compuestos, los valores promedio calculados para distintos tiempos de reacción se compararon mediante este método y las diferencias se consideraron significativas para valores de $P < 0,05$.

Tabla 4.4. Contenido de lípidos neutros en la lecitina cruda de girasol nativa y modificada mediante hidrólisis a distintos tiempos de reacción, entre 30 y 360 min (t_h).

Composición de Lípidos Neutros en la Lecitina Cruda Nativa y Modificada						
(g/ 100 g lecitina)*						
t_h (min)	MGs	CV%**	DGs	CV%**	TGs	CV%**
0	0,41 ^a	3,16	1,86 ^a	4,73	26,36 ^e	5,70
30	0,45 ^a	4,68	2,79 ^b	4,99	21,56 ^d	7,62
60	3,47 ^d	3,40	6,47 ^d	1,98	12,10 ^c	7,59
90	2,18 ^c	4,51	3,11 ^c	2,99	5,75 ^b	9,28
180	0,82 ^b	4,21	2,62 ^b	3,66	2,2 ^a	8,09
360	0,78 ^b	4,53	2,36 ^b	4,45	2,01 ^a	9,47

* Media aritmética; $n = 4$.

** CV%: Coeficiente de variación %

Letras iguales en una misma columna indican que no existen diferencias significativas al 95% de confianza ("a" corresponde al menor valor y "e" al mayor).

Puede verse que para los valores obtenidos de MGs y DGs los coeficientes de variación (CV%) fueron menores al 5%. Sin embargo para TGs los CV% resultaron algo mayores.

Los resultados obtenidos evidencian la acción lipasa de la enzima, observándose cambios en la composición de los tres tipos de lípidos neutros, a lo largo de la hidrólisis. Puede observarse que los cambios importantes en la composición comienzan luego de 60 min de reacción, teniéndose una etapa inicial ($t_h = 30$ min) donde el contenido de MGs no presenta cambios significativos, y el contenido de DGs y TGs varía ligeramente.

Puede verse también que a tiempos mayores a 3 h (180 min) no se obtuvieron cambios significativos en la composición, lo que sugiere que la reacción alcanzaría el estado estacionario en ese tiempo.

En la **Figura 4.9** se muestra un esquema de las posibles reacciones de hidrólisis sufridas por los distintos tipos de lípidos neutros presentes en el sustrato y las muestras modificadas.

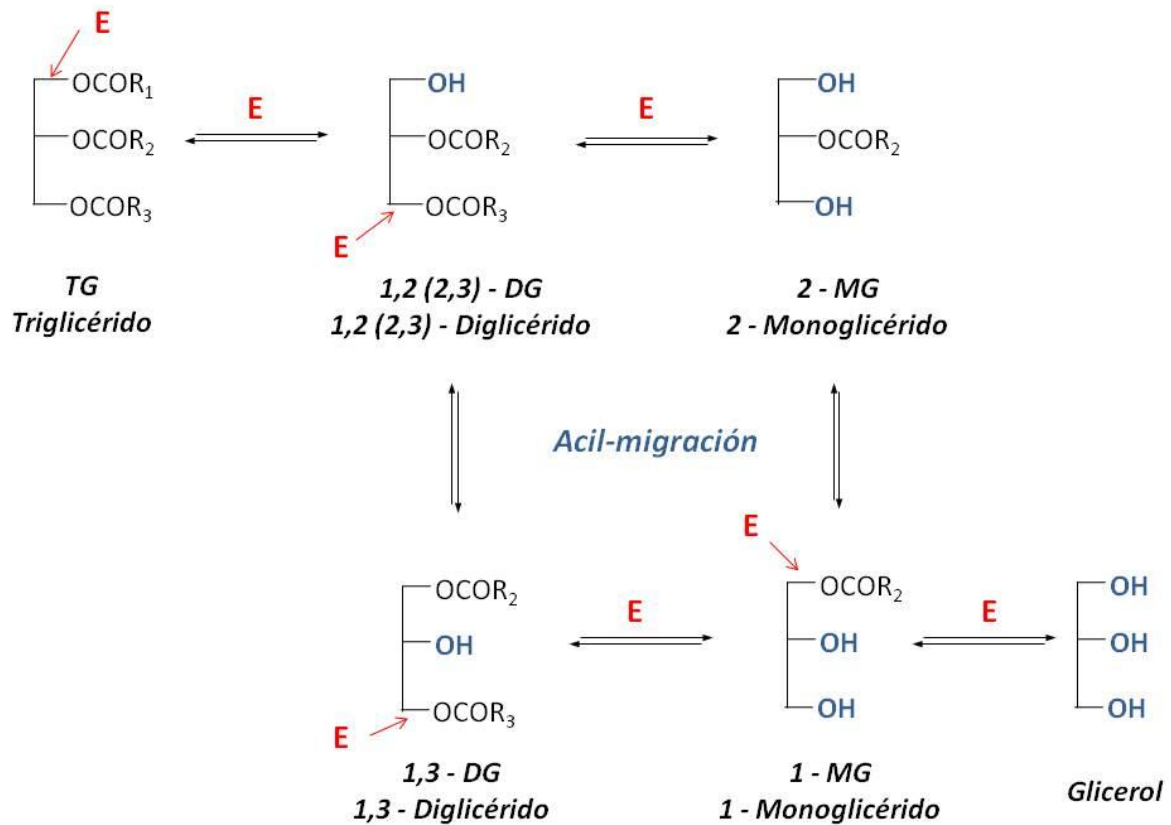


Figura 4.9. Reacción de hidrólisis de lípidos neutros catalizada por Lecitase® Ultra (E).

Según se encontró en la literatura, la acción lipasa de la enzima presenta especificidad 1,3 en TGs, DGs y MGs, debido a la similitud en su conformación con las 1,3-lipasas. La acil-

migración, es un mecanismo no enzimático ampliamente conocido, por ocurrir en compuestos lipídicos con un grupo oxidrilo libre. Esta reacción que normalmente ocurre en medio acuoso y con altas temperaturas, es catalizada por ácidos o bases, y es un proceso termodinámico por el cual la molécula tiende a formar su isómero más estable, por lo que es muy difícil de evitar (Yang y col., 2005; Wang y col., 2010).

De esta manera, la migración del grupo acilo de la posición *sn*-2 a la posición *sn*-1, podría generar un posterior ataque de la enzima en el isómero formado, como se muestra en la **Figura 4.9**, generando así todos los tipos de compuestos mostrados. Esto se ve reflejado al comparar la composición de la lecitina nativa con la de las muestras hidrolizadas. Puede verse un incremento en la concentración de especies 1-MGs, y 1,3-DGs, como por ejemplo el caso de las 1-MP, 1-MO, 1,3-PP y 1,3-OL (Figuras 4.7 y 4.8), lo que avala la hipótesis de la ocurrencia de la acil-migración, teniendo en cuenta que la enzima tiene una especificidad 1,3.

Debido a esta acil-migración, a pesar de que la técnica cromatográfica permitió distinguir entre los distintos isómeros 1,2- y 1,3- de los DGs y entre los 1- y 2- de los MGs, no puede utilizarse esta información para evaluar la especificidad de la enzima en la posición 1,3 ni la selectividad sobre un AG en particular.

Lo discutido en el análisis de AGLs para el ácido linoleico, refuerza la hipótesis de la ocurrencia de la reacción de acil-migración en el medio de reacción.

Sin embargo, las propiedades surfactantes de los DGs y MGs son ampliamente conocidas, y no difieren con la posición o el tipo de AG que contengan. Por lo tanto para los objetivos de esta tesis, los DGs y MGs en su totalidad sin necesidad de distinguir entre sus distintas especies, son compuestos que resultan de interés dentro de la fase aceite de la muestra de

lecitina cruda. Por ello, tener información sobre la composición total de estas especies puede ser de mucha utilidad para la caracterización de los productos obtenidos en la modificación según el tiempo de hidrólisis utilizado.

4.2.3. FOSFOLÍPIDOS

En un primer intento de cuantificación de fosfolípidos (PLs) y lisofosfolípidos (LPLs) se utilizó cromatografía líquida de alta performance con un detector de UV-visible (HPLC-UV). La técnica utilizada se detalla en el capítulo 3, (sección 3.3.4).

La reacción de hidrólisis y la inyección en el cromatógrafo se realizaron por duplicado, lo que da un total de 4 muestras para cada punto de reacción.

En la **Figura 4.10** se muestra un cromatograma correspondiente a la lecitina hidrolizada con un tiempo de hidrólisis (t_h) de 60 min.

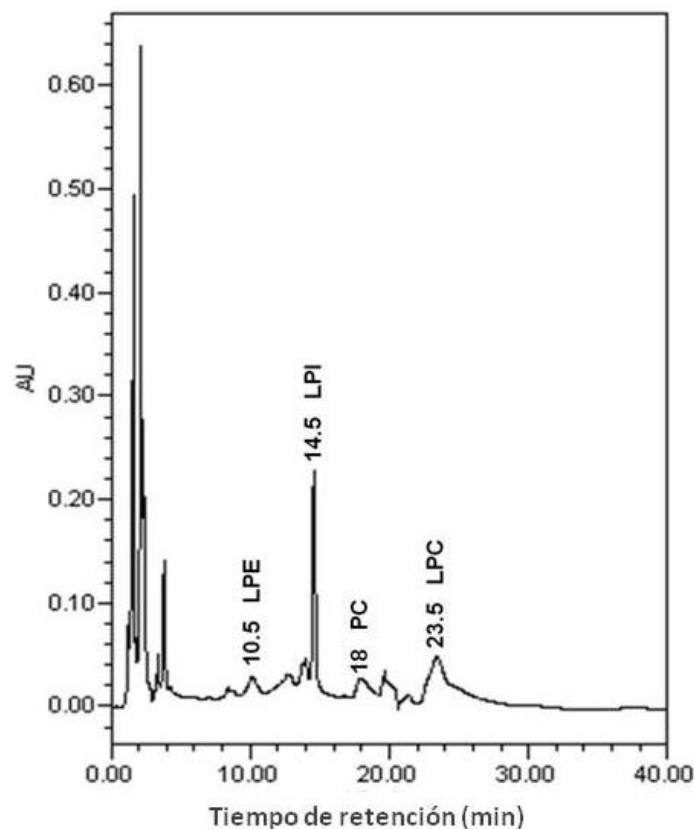


Figura 4.10. Ejemplo de cromatograma para la determinación de fosfolípidos y lisofosfolípidos mediante HPLC-UV, en lecitina cruda de girasol modificada con un tiempo de hidrólisis de 60 min. Se muestran los picos correspondientes a fosfatidilcolina (PC), lisofosfatidilcolina (LPC), lisofosfatidilinositol (LPI), y lisofosfatidiletanolamina (LPE).

En la figura puede observarse que no se obtuvo una buena resolución para todos los picos de las diferentes especies de PLs y LPLs presentes en la muestra. Así mismo existen señales que no lograron identificarse.

En las **Tablas 4.5, 4.6 y 4.7**, se muestran los resultados de la determinación de fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), y fosfatidiletanolamina (PE) respectivamente, junto con sus formas hidrolizadas (lisofosfatidilcolina, lisofosfatidilinositol y lisofosfatidiletanolamina, respectivamente). Cabe aclarar que con esta técnica no pudo

determinarse ácido fosfatídico (PA), fosfoglicerol (PG), ni sus formas hidrolizadas (ácido lisofosfatídico o LPA y lisofosfoglicerol o LPG).

Para todos los compuestos, los valores promedio calculados para los distintos tiempos de reacción se compararon mediante un test de Student (*t*-test), y las diferencias se consideraron significativas para valores de $P < 0,05$.

Para los PLs puede calcularse un grado de hidrólisis ($\%H_{PL}$) para cada tiempo de reacción como:

$$\%H_{PL} = \frac{[PL_0] - [PL_t]}{[PL_0]} \times 100 \quad (4.1)$$

Donde $[PL_0]$ es la concentración de PLs (en mmol/ g lecitina) a $t_h = 0$ y $[PL_t]$ la correspondiente a cada tiempo de hidrólisis.

En la **Tabla 4.5** puede observarse que los coeficientes de variación obtenidos para los valores de PC son entre 4 y 10%. Esto concuerda con lo reportado por Penci (2009) quien mediante esta técnica obtuvo coeficientes de variación para PC de 12,8% en muestras de lecitina de soja y 6,8% en lecitina de girasol. Para la lisofosfatidilcolina (LPC) en cambio, estos valores son un poco más elevados (entre 10 y 25%).

Tabla 4.5. Composición de fosfatidilcolina (PC) y lisofosfatidilcolina (LPC) en lecitina cruda de girasol, nativa e hidrolizada a diferentes tiempos de reacción, determinada por HPLC-UV.

<i>Determinación de PC y LPC mediante HPLC-UV</i>				
t_h (min)	PC*	CV%**	LPC*	CV%**
0	10,33 ^d	5,82	0,00 ^d	-
30	0,65 ^c	5,36	6,44 ^c	10,27
60	0,47 ^b	9,96	4,78 ^b	22,96
90	0,34 ^a	9,83	3,03 ^b	10,29
180	0,42 ^a	4,06	0,94 ^a	24,40
360	0,41 ^a	6,22	1,06 ^a	22,57

* g/ 100 g lecitina; media aritmética; n = 4.

** CV%: Coeficiente de variación (%).

Letras iguales en una misma columna indican que no existen diferencias significativas, con un 95% de confianza ("a" corresponde al menor valor y "d" al mayor).

Los datos obtenidos sugieren que durante la primera media hora de reacción ($t_h = 30$ min) ocurre la hidrólisis de casi la totalidad de PC presente en el sustrato, representando un 94% de hidrólisis (%H_{PL}) para esta especie. La LPC por su parte, presenta un brusco aumento durante los primeros 30 min de reacción, para luego comenzar a disminuir a medida que avanza la hidrólisis, lo que sugiere una acción lisofosfolipasa de la enzima Lecitase® Ultra.

Con respecto al fosfatidilinositol, puede verse en la **Tabla 4.6** que los coeficientes de variación obtenidos tanto para PI como para LPI también fueron más altos que para PC, presentando valores de CV de hasta un 29%.

Tabla 4.6. Composición de fosfatidilinositol (PI) y lisofosfatidilinositol (LPI) en lecitina cruda de girasol, nativa e hidrolizada a diferentes tiempos de reacción, determinada por HPLC-UV.

<i>Determinación de PI y LPI mediante HPLC-UV</i>				
t_h (min)	PI*	CV%**	LPI*	CV%**
0	22,08 ^e	2,64	2,75 ^a	26,04
30	17,20 ^d	29,24	28,47 ^b	29,24
60	14,70 ^c	24,61	39,30 ^b	24,61
90	10,83 ^b	16,27	40,08 ^b	24,24
180	9,02 ^{a,b}	29,61	30,70 ^b	29,61
360	8,24 ^a	24,74	22,88 ^b	24,74

* g/ 100 g lecitina; media aritmética; n = 4.

** CV%: Coeficiente de variación (%).

Letras iguales en una misma columna indican que no existen diferencias significativas, con un 95% de confianza ("a" corresponde al menor valor y "e" al mayor).

En este caso, los resultados obtenidos sugieren que la hidrólisis de PI no es tan brusca como para PC. Para los primeros 30 min de reacción, con los valores hallados de PI se determinó un %H_{PL} de solo 22%, valor que alcanzó un 64% al cabo de 6 h de reacción ($t_h = 360$ min).

Observando los valores promedio para LPI puede verse un comportamiento similar al presentado por LPC. Observándose un brusco aumento a los 30 min de reacción, alcanzando un máximo a los 90 min, para luego comenzar a disminuir con el avance de la reacción. Sin embargo, el análisis estadístico de comparación de medias reflejó que los valores para t_h entre 30 y 360 min no pueden ser considerados distintos entre sí, al no encontrar diferencias significativas.

Más allá de esto, si se observan los valores promedio, aunque se consideren iguales entre sí, los resultados obtenidos no corresponden con lo observado para PI.

Puede verse que se obtienen valores mucho más altos para LPI de lo esperado. Por ejemplo, para $t_h = 30$ min se tiene una disminución de PI de 4,88 g/100 g lecitina, lo que correspondería a un aumento de 3,29 g/ 100 g lecitina de LPI, según los pesos moleculares de cada una de estas especies. Sin embargo se observa un aumento de LPI de 25,72 g/ 100 g lecitina. Esto lleva a pensar que los datos obtenidos conllevan un gran error experimental, que puede deberse a una mala identificación o mala resolución del pico correspondiente. Por otra parte, la respuesta del detector UV depende del grado de insaturación de los AGs que contengan los PLs y LPLs, por lo que para una cuantificación más adecuada, es necesaria la utilización de estándares de PLs del mismo origen que las muestras (Bünger & Pison, 1995; Kiełbowicz y col., 2012). En este caso se utilizaron los patrones disponibles en el laboratorio, siendo la mayoría PLs y LPLs de soja (PC, PI, PE, LPC y LPI), algunos de yema de huevo (LPE) y sintéticos (PA y LPA). Por lo tanto esta diferencia en la composición de AGs entre la muestra a analizar y los patrones puede ser una de las causas de error en la cuantificación. En el capítulo 5 se realiza una descripción de las ventajas y desventajas de las distintas técnicas analíticas empleadas para la determinación de PLs y LPLs, incluida la HPLC-UV.

En la **Tabla 4.7** se presentan los resultados obtenidos para PE. Puede verse que en este caso se obtuvieron coeficientes de variación muy variables, desde un 0,34% para PE en la lecitina nativa, hasta un 29% para la muestra correspondiente a un $t_h = 60$ min.

Tabla 4.7. Composición de fosfatidiletanolamina (PE) y lisofosfatidiletanolamina (LPE) en lecitina cruda de girasol, nativa e hidrolizada a diferentes tiempos de reacción, determinada por HPLC-UV.

Determinación de PE y LPE mediante HPLC-UV				
t_h (min)	PE*	CV%**	LPE*	CV%**
0	1,52 ^c	0,34	0,00 ^d	-
30	0,03 ^b	8,19	63,20 ^c	20,21
60	0,05 ^b	28,81	56,85 ^c	18,26
90	0,01 ^a	11,18	34,65 ^b	32,78
180	0,01 ^a	28,31	14,44 ^a	26,46
360	0,01 ^a	24,40	11,03 ^a	35,69

* g/ 100 g lecitina; media aritmética; n = 4.

** CV%: Coeficiente de variación (%).

Letras iguales en una misma columna indican que no existen diferencias significativas, con un 95% de confianza ("a" corresponde al menor valor y "d" al mayor).

Para lisofosfatidiletanolamina se obtuvieron todos coeficientes de variación elevados, entre 18% y 35%. Igualmente puede verse que el comportamiento de PE es similar al observado para PC con una brusca disminución a la media hora de reacción, presentando un %H_{PL} del 98%.

La LPE por su parte, posee un comportamiento similar al observado para las otras especies de LPLs, presentando un brusco aumento durante los primeros 30 min de hidrólisis, para luego comenzar a disminuir con el avance de la reacción.

En este caso ocurre lo mismo que para PI/LPI, encontrándose inconsistencias en el balance de masa para las especies PE/LPE. Por ejemplo en el caso de las muestras correspondientes a

$t_h = 30$ min, se tiene una disminución de PE de 1,49 g/ 100 g lecitina, lo que correspondería a un aumento de LPE de 1,20 g/ 100 g lecitina. Sin embargo los resultados obtenidos muestran un aumento de LPE para dicho tiempo de hidrólisis de 63,20 g/ 100 g lecitina.

Cabe aclarar que debido a esta inconsistencia en los balances de masa para PI-LPI y PE-LPE, además de los altos coeficientes de variación obtenidos, se realizaron varias repeticiones para verificar que no se trate de errores propios del analista. De todas las repeticiones realizadas, se eligieron los resultados obtenidos que presentaron los coeficientes de variación más pequeños, que como puede verse, aún son elevados.

Estos altos coeficientes de variación obtenidos y las inconsistencias encontradas en el balance de masa para PI-LPI y PE-LPE, sugieren que los resultados cuantitativos no son del todo confiables. Por lo tanto sólo pueden hacerse observaciones acerca de las tendencias mostradas por las especies que pudieron determinarse mediante esta técnica. Para PC y PE se observó una brusca disminución durante los primeros 30 min de reacción, obteniéndose valores de hidrólisis del 94% y 98% respectivamente. Para PI sin embargo la hidrólisis observada fue más suave, con un valor máximo del 64% para $t_h = 360$ min.

Esto sugiere una selectividad de la enzima Lecitase® Ultra para la hidrólisis de PLs del siguiente orden:

$$PE \cong PC \gg PI$$

En cuanto a los LPLs, se observó en todos los casos un aumento brusco al comienzo de la reacción. En el caso LPC y LPE se observó que la concentración alcanzaba un máximo, para luego comenzar a disminuir con el avance de la reacción. Esto sugiere una acción de la enzima como lisofosfolipasa.

Sin embargo para verificar esto, sería conveniente la determinación de la forma más hidrolizada de los PLs, los glicerofosfolípidos, ya sin ningún ácido graso en la molécula.

Los PLs y LPLs son los compuestos que presentan mayor interés en esta tesis, ya que su objetivo principal es la modificación de la lecitina cruda para la obtención de productos con mayor contenido en LPLs. Por lo tanto resultó necesario tener una información segura y confiable acerca del contenido de los mismos tanto en la lecitina nativa utilizada como sustrato como en las muestras modificadas. Por ello, se realizó una búsqueda bibliográfica de las diferentes técnicas utilizadas para el análisis de dichos compuestos para evaluar la implementación o el desarrollo de otra metodología que permita obtener información más precisa sobre la evolución de estos compuestos a lo largo de la hidrólisis.

4.3. CONCLUSIONES

Las condiciones óptimas de reacción encontradas concuerdan con datos reportados posteriormente por varios autores, avalando los resultados obtenidos en este capítulo. El uso de solventes orgánicos requiere medidas de seguridad, lo que resulta una desventaja para su uso a nivel industrial, además de requerir una etapa posterior de separación del producto obtenido para que resulte apto para su uso como aditivo alimenticio; aumentando los costos de producción. Por ello el uso de un sistema libre de solvente para la hidrólisis enzimática de lecitina cruda presenta una ventaja, pensando en una futura aplicación del proceso a nivel industrial.

En cuanto al perfil de ácidos grasos encontrado, se observó una preferencia de la enzima por hidrolizar el ácido palmítico, no siendo éste el ácido graso mayoritario. Además se evidenció un aumento significativo en la concentración del ácido linoleico, siendo un AG cuya posición natural en los PLs y TGs es la *sn*-2, lo que podría estar relacionado con la ocurrencia del proceso de acil-migración en el medio de reacción.

Los resultados obtenidos demostraron una acción lipasa de la enzima Lecitase® Ultra, hidrolizando a los lípidos neutros presentes en la lecitina cruda, lo que concuerda con lo informado por varios autores en la literatura. La hidrólisis de los LN comenzó a hacerse notable luego de la primera hora de reacción. Algunos autores han encontrado que la fosfatidilcolina inhibe la actividad lipasa de Lecitase® Ultra, compitiendo por el sitio activo de la enzima (Mishra et al., 2009). Esto podría explicar el aumento en la actividad lipasa de la enzima a partir de los 60 min de reacción, cuando se ha alcanzado más de un 90% de hidrólisis para la PC.

El incremento observado en la concentración de 1-MGs, y 1,3-DGs, considerando que la enzima presenta una especificidad 1,3, evidenció la ocurrencia de la acil-migración.

Se observó que todas las muestras obtenidas a diferentes tiempos de hidrólisis presentaban diferencias en su composición, lo que seguramente otorgue características emulsionantes y dispersantes propias a cada una de ellas.

Por ejemplo, en la muestra hidrolizada a $t_h = 1$ h el alto contenido de MGs y DGs podría dar como resultado un producto con características emulsionantes mejoradas con respecto a las lecitinas modificadas puras, que solo contienen PLs, LPLs y AGLs.

Puede decirse que en las condiciones de reacción estudiadas la hidrólisis de TGs y PLs ocurre en mayor medida durante las dos primeras horas de reacción.

Esto indicaría que mediante la hidrólisis de lecitina cruda de girasol utilizando Lecitase® Ultra, es posible obtener mezclas de TGs, DGs, MGs, PLs, LPLs, AGL e incluso glicerol, dependiendo del avance de la reacción. Estas mezclas podrían presentar propiedades emulsionantes específicas de gran interés para diferentes aplicaciones.

También podría considerarse el fraccionamiento posterior de la lecitina modificada, obteniendo por un lado la fase de lípidos neutros con un alto contenido de MGs y DGs, y por otro lado, la fracción polar compuesta con un alto contenido de LPLs. Ambas fracciones presentarán características emulsionantes propias para distintas aplicaciones en la industria farmacéutica y de alimentos.

Por último, no se logró una buena resolución en la determinación de PLs y LPLs por la técnica cromatográfica HPLC-UV, no pudiendo conocer de manera confiable la composición de los mismos en la lecitina nativa y modificada, y así evaluar tanto la cinética de reacción, como así también la caracterización de los compuestos obtenidos para su aplicación como

emulsionantes. Además debido a que esta técnica no permitió la identificación y cuantificación de algunos fosfolípidos que según bibliografía están presentes en la lecitina de girasol (PA y PG), la caracterización de lecitina nativa y modificada estaría incompleta si se consideran sólo los resultados obtenidos mediante esta metodología. Otra desventaja es que esta técnica no permite realizar el seguimiento de los glicerofosfolípidos durante la hidrólisis lo que permitiría confirmar la acción como lisofosfolipasa de la enzima, sugerida por la tendencia observada en los resultados para LPLs. Por ello, y considerando que la literatura sugiere la resonancia magnética de fósforo (P-NMR) como el método más preciso para la identificación y cuantificación de PLs y LPLs (van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008; Cabezas y col., 2011), se decidió desarrollar una técnica de determinación cuali- y cuantitativa de estas especies mediante el uso de dicha metodología.

Este desarrollo y las especificaciones finales para la técnica desarrollada se describen en el capítulo siguiente. La determinación de PLs y sus formas hidrolizadas en las muestras de lecitina de girasol nativa y modificada mediante el método propuesto se describen luego en capítulo 6.

4.4. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados presentados en este capítulo fueron parcialmente publicados en los siguientes trabajos en congresos:

“Hidrólisis de Lípidos Neutros a partir de Lecitina Cruda de Girasol Utilizando Fosfolipasa A₁ como Catalizador”. **Goñi, M.L;** Pacheco C; Constenla, D.T; Carelli, A.A.

Presentación oral y trabajo completo publicado en los Proceedings del XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos – CYTAL 2011. Argentina, Octubre de 2011.

“Obtención de lisofosfolípidos mediante la Hidrólisis Enzimática de lecitina de girasol”. **Goñi, M.L;** Constenla, D.T; Carelli, A.A.

Póster y Trabajo corto presentado en la “II Reunión Interdisciplinaria de Tecnología y Procesos Químicos - RITeQ 2010”. Argentina, Octubre de 2010.

“Sunflower Lecithin Hydrolysis by Phospholipase A₁. Effect of Reaction System”. **Goñi, M.L;** Constenla, D.T; Carelli, A.A.

Póster presentado en el 101st AOCS Annual Meeting & Expo. abstract #36323. Arizona, USA, Mayo de 2010.

“Kinetic Study of Sunflower Lecithin Hydrolysis Using Phospholipase A₁”. **Goñi, M.L;** Constenla, D.T; Carelli, A.A.

Póster presentado en el 101st AOCS Annual Meeting & Expo. abstract #36330. Arizona, USA, Mayo de 2010.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

- Artz, W. E. (1990).** Capítulo 10: Emulsifiers. En *Food Additives* (pp. 347–393). Marcel Dekker Inc., New York.
- Brummer, R. (2006).** *Rheology Essentials of Cosmetic and Food Emulsions*. Springer-Verlag, Berlin.
- Bünger, H., & Pison, U. (1995).** Quantitative analysis of pulmonary surfactant phospholipids by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 672(1), 25–31.
- Cabezas, D. M., Madoery, R., Diehl, B. W. K., & Tomás, M. C. (2011).** Application of enzymatic hydrolysis on sunflower lecithin using a pancreatic PLA2. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 443–446.
- Carelli, A.A., CECI, L., CRAPISTE, G. (2002).** Phosphorus-to-phospholipid conversion factors for crude and degummed sunflower oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 1177-1180.
- Dennis, E. A. (1994).** Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 13057–13060.
- Dijkstra, A. J. (2011).** Edible Oil Processing – Refining. Deguming. *The AOCS Lipids Library*. <http://lipidlibrary.aocs.org/processing/degum-intro/index.htm> (último acceso 07/2014).
- Guiotto, E. N. (2014).** *Aplicación de Subproductos de Chía (Salvia hispanica L.) y Girasol (Helianthusannuus L.) en Alimentos*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Gutiérrez, C., Carelli, A. A., & Ferreira, L. (2007).** Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 35–43.
- Hasenhuettl, G. L. (2008).** *Food Emulsifiers and Their Applications* (2° ed.). Springer, New York.

- Hollo, J., Peredi, J., Ruzics, A., Jerbnek, M., & Erdelyi, A. (1993).** Sunflower lecithin and possibilities for utilization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(10), 997–1001.
- Kiełbowicz, G., Smuga, D., Gładkowski, W., Chojnacka, A., & Wawrzenczyk, C. (2012).** An LC method for the analysis of phosphatidylcholine hydrolysis products and its application to the monitoring of the acyl migration process. *Talanta*, 94, 22–29.
- Liu, N., Wang, Y., Zhao, Q., Zhang, Q., & Zhao, M. (2011).** Fast synthesis of 1,3-DAG by Lecitase® Ultra-catalyzed esterification in solvent-free system. *European Journal of Lipid Science and Technology : EJLST*, 113(8), 973–979.
- Mishra, M. K., Kumaraguru, T., Sheelu, G., & Fadnavis, N. W. (2009).** Lipase activity of Lecitase® Ultra: characterization and applications in enantioselective reactions. *Tetrahedron Asymmetry*, 20(24), 2854–2860.
- Pacheco, C., Palla, C., Crapiste, G. H., & Carrín, M. E. (2014).** Simultaneous Quantitation of FFA, MAG, DAG, and TAG in Enzymatically Modified Vegetable Oils and Fats. *Food Analytical Methods. En Prensa*.
- Penci, M. C. (2009).** *Modificación Enzimática de Lecitinas*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur, Argentina.
- Robertson, D., Hellweg, T., Tiersch, B., & Koetz, J. (2004).** Polymer-induced structural changes in lecithin/sodium dodecyl sulfate-based multilamellar vesicles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 270, 187–194.
- Schaloske, R. H., & Dennis, E. a. (2006).** The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761(11), 1246–59.
- Van Nieuwenhuyzen, W., & Tomás, M. C. (2008).** Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(5), 472–486.
- Wang, Y., Zhao, M., Ou, S., & Song, K. (2009).** Partial hydrolysis of soybean oil by phospholipase A1 to produce diacylglycerol-enriched oil. *Journal of Food Lipids*, 16, 113–132.

- Wang, Y., Zhao, M., Song, K., Wang, L., Tang, S., & Riley, W. W. (2010).** Partial hydrolysis of soybean oil by phospholipase A1 (Lecitase Ultra). *Food Chemistry*, 121(4), 1066–1072.
- Wendel, A. (2000).** Lecithin. En *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Whitehurst, R. J. (2004).** *Emulsifiers in Food Technology*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford.
- Yang, J., Wang, Y., Yang, B., Mainda, G., & Guo, Y. (2006).** Degumming of vegetable oil by a new microbial lipase. *Food Technology and Biotechnology*, 44(1), 101–104.
- Yang, T., Fruekilde, M. B., & Xu, X. (2005).** Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. *Food Chemistry*, 92(1), 101–107.
- Yu, D., Ma, Y., Xue, S. J., Jiang, L., & Shi, J. (2013).** Characterization of immobilized phospholipase A1 on magnetic nanoparticles for oil degumming application. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 519–525.
- Zhang, K., Liu, Y., & Wang, X. (2012).** Enzymatic preparation of L-α-glycerylphosphorylcholine in an aqueous medium. *Journal of Lipid Science and Technology*, 1254–1260.

CAPÍTULO V:
DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE
³¹P-NMR PARA LA
DETERMINACIÓN DE
FOSFOGLICÉRIDOS
EN LECITINAS

Un problema que valga la pena atacar demuestra su valor no dejándose amansar

(Piet Hein)

5. DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE ^{31}P -NMR PARA DETERMINACIÓN DE FOSFOGLICÉRIDOS EN LECITINAS.

Como ya se explicó en el capítulo anterior, debido a que la metodología utilizada en el grupo para la determinación de fosfolípidos no resultó del todo adecuada para la determinación de lisofosfolípidos en las muestras obtenidas en esta tesis, se realizó una búsqueda bibliográfica de los diferentes métodos empleados para la determinación de dichos compuestos. Se concluyó que la técnica más adecuada para estas muestras es la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de fósforo (^{31}P -NMR) y se decidió desarrollar una metodología durante una estadía en la Universidad de Gante (Bélgica), aprovechando la tecnología y el conocimiento con los que contaban en el Grupo de Partículas y Tecnología Interfacial liderado por el Prof. Dr. Paul Van der Meeren (Departamento de Físicoquímica Aplicada, Facultad de Bioingeniería). En este capítulo se describe con detalle el desarrollo de esta metodología analítica y su validación, para la determinación de fosfoglicéridos presentes en la lecitina cruda de girasol y las muestras modificadas.

5.1. INTRODUCCIÓN

Antes de comenzar con el detalle del desarrollo experimental, se presenta una breve revisión de las técnicas analíticas existentes para determinación de lípidos, en particular de fosfolípidos (PLs) y lisofosfolípidos (LPLs).

5.1.1. REVISIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS PARA DETERMINACIÓN DE PLS

La composición de PLS de diferentes fuentes ha sido analizada por varias metodologías cromatográficas a lo largo de la historia, como son la cromatografía en capa fina (o en inglés thin-layer chromatography, TLC), y la cromatografía líquida de alta performance (Myher & Kuksis, 1995; Pan y col., 2003; Baeza Jimenez, 2013; Nguyen y col., 2014).

La metodología más antigua utilizada durante muchos años para el análisis de lípidos es la cromatografía en capa fina (**TLC**). Mediante este método la intensidad y tamaño de las bandas (o marcas) coloreadas en el cromatograma pueden usarse para determinación semicuantitativa de PLS (AOCS Recommended Practice Ja 7-86, 2003). Este método no requiere instrumental específico, presenta bajo costo de operación y no existen demasiadas restricciones en los solventes a utilizar. Sin embargo, depende enormemente de la habilidad del analista, por lo que se trata de un método de muy baja reproducibilidad. La TLC tradicional luego fue mejorada con el desarrollo de instrumental específico o software apropiado para el análisis de las bandas obtenidas. Con el desarrollo de la TLC de alta performance (**HPTLC**) se mejoró su repetitividad, permitiendo actualmente la determinación más precisa de casi todas las clases de fosfolípidos y glicolípidos en lecitinas vegetales de manera reproducible. Sin embargo esta técnica presenta la desventaja de que no permite la determinación de las distintas clases de LPLs ni glicerofosfolípidos (GPLs), productos de

hidrólisis de PLs. (Peterson & Cummings, 2006; van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008; Vyssotski y col., 2009).

Por su parte, la cromatografía líquida de alta performance (**HPLC**) se ha convertido en una de las metodologías más usadas para la separación y determinación de lípidos (Peterson & Cummings, 2006). Existen distintos detectores que pueden ser utilizados acoplados al equipo de HPLC. Podría decirse que el más común de ellos es el detector UV (**HPLC-UV**), por su amplia disponibilidad en laboratorios analíticos. Sin embargo, desafortunadamente, la detección por UV está limitada a compuestos cromóforos que absorban en el rango de longitud de onda UV (195-370 nm), por lo que es habitual que los fosfolípidos con ácidos grasos saturados den señales bajas y su cuantificación por este método dé resultados menores a los reales. Por ello, para una cuantificación más adecuada, es necesaria la utilización de estándares de PLs del mismo origen que las muestras, los que no siempre están disponibles (Bünger & Pison, 1995; Kiełbowicz y col., 2012). Asimismo, algunos autores han utilizado la derivatización química para lograr que absorban radiación UV o sean capaces de emitir fluorescencia (Luquain y col., 2001). Como desventaja adicional, cabe destacar la absorbancia considerable que presentan los solventes habitualmente empleados en la disolución de compuestos lipídicos (como el cloroformo). Esto dificulta la obtención de una adecuada relación señal/línea de base, lo cual constituye una interferencia en la determinación analítica. Por ello, la elección de la fase móvil está limitada a solventes con baja o nula absorbancia en el rango UV (Bünger & Pison, 1995; Penci, 2009; Cabezas, 2010).

Algunas variantes al detector UV que normalmente se utilizan para el análisis de PLs mediante HPLC son el de espectrometría de masas, (MSD, del inglés: Mass Spectrometry

Detector) y el de dispersión de luz evaporativo (ELDS del Inglés: Evaporative Light-Scattering Detector).

La espectrometría de masas es considerada como un método de identificación selectivo y universal. En resumen, los analitos que se eluyen de la columna cromatográfica son ionizados y separados de acuerdo a su relación m/z (masa/carga del ión), pudiendo generarse iones con carga positiva o negativa. La principal desventaja de estos sistemas es que poseen un alto costo de adquisición y requieren entrenamiento en la interpretación de los espectros obtenidos. Ekroos y col. (2002) han reportado que la HPLC en fase reversa, acoplada a espectrometría de ionización de masas por electro-spray (**RP-HPLC-ESI-MS/MS**) es una herramienta poderosa para el análisis de las distintas especies de fosfolípidos debido a la alta selectividad del método. Sin embargo, para altas concentraciones de fosfolípidos, se vuelve difícil su identificación y cuantificación simultánea debido a la formación de agregados, debiendo seleccionarse con cuidado las condiciones de operación (Peterson & Cummings, 2006; Lee y col., 2010).

Por otra parte, el método por **HPLC-ELSD** permite la identificación y cuantificación de 6 clases de PLs, siendo preferido por sobre el método que aplica HPLC-UV, debido a que presenta una mayor reproducibilidad y menor interferencia de los componentes de la fase móvil. Al utilizar HPLC-ELSD es condición necesaria que los analitos no sean compuestos volátiles; ya que el principio de funcionamiento es que éstos, al salir de la columna junto con la fase móvil (solventes volátiles) ingresan a una cámara calefaccionada donde la fase móvil es evaporada mediante una corriente de aire o nitrógeno y el analito, que no es evaporado sino nebulizado en pequeñas gotas, pasa a través de un haz de luz. Existe una relación entre la cantidad de analito eluído y la cantidad de luz desviada, la que puede medirse y de esta

manera cuantificar los analitos en relación a un estándar externo. Este detector surgió como una herramienta muy eficaz en el análisis cuali-cuantitativo de PLs presentes en lecitinas nativas de origen vegetal, aunque en presencia de lecitinas de composición más compleja (acetiladas, hidrogenadas o hidrolizadas) presenta limitaciones de resolución considerables (Diehl, 2001; van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008; Cabezas, 2010).

van Nieuwenhuyzen & Tomás (2008) aseguran que se requiere un mayor desarrollo de las metodologías de HPLC para realizar el seguimiento de manera precisa de la formación de LPLs durante la hidrólisis enzimática de lecitinas, y sugieren que actualmente el método más adecuado para el análisis de PLs y LPLs es la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de fósforo (^{31}P -NMR). Cerca de 15 especies de PLs y LPLs pueden analizarse cuantitativamente utilizando fósforo como referencia absoluta. La única desventaja del método es el alto costo del equipamiento, que suele estar disponible sólo en laboratorios especializados. Sin embargo, si se cuenta con acceso al equipamiento necesario, la ^{31}P -NMR comparada con los métodos cromatográficos tiene muchas ventajas: permite la identificación de todas las especies de PLs y LPLs comúnmente presentes en lecitinas; es un método no destructivo que además no requiere la separación, purificación o derivatización previa de los analitos; y utiliza un único estándar para la cuantificación de todas las especies, sin la necesidad de realizar curvas de calibración (Sotirhos y col., 1986; Diehl, 2001; Frank, 2013).

En resumen, las técnicas cromatográficas no son las más adecuadas para la cuantificación simultánea de PLs y LPLs o la identificación de todas las clases de ambos compuestos, ya que incluyen procedimientos largos de preparación de muestra y determinación, y presentan baja selectividad y especificidad de detección (Moreau, 2004; Lee y col., 2010). Algunos

autores reportaron que ciertos intentos de identificar fosfolípidos de baja polaridad, como la fosfatidiletanolamina (PE), con métodos cromatográficos han traído errores en la identificación, y sugieren el uso de NMR para su determinación cuali-cuantitativa (Turner, 2002; Vyssotski y col., 2009).

5.1.2. ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La resonancia magnética nuclear (NMR, del inglés: *Nuclear Magnetic Resonance*) constituye una metodología experimental con un amplio y reconocido espectro de aplicaciones en el campo del análisis estructural. Tuvo sus inicios a principios de la década de 1950, cuando se comercializaron los primeros espectrómetros para la obtención de espectros de protones, tras el descubrimiento de la resonancia en 1945 (Karaghiosoff, 2007).

La NMR es una metodología que se basa en la medición de la energía asociada a la reorientación de los núcleos en presencia de un campo magnético. Este fenómeno plantea que los núcleos de los átomos cuando son sometidos a un campo magnético externo y reciben pulsos de radiofrecuencia (10-600 MHz) absorben radiación electromagnética (Diehl, 2001; Cabezas, 2010; Guiotto, 2014). Esta absorción de energía origina la rotación de los núcleos, cambiando su orientación, los que, al suspender el pulso, vuelven a su estado original. La variación de voltaje que esto produce se denomina FDI (del inglés: *Free Induction Decay*) y es detectada por el receptor del equipo y decodificada usando el algoritmo de la transformada de Fourier. La frecuencia de resonancia (rotación) de un núcleo particular es proporcional a la fuerza del campo magnético que experimenta, y depende sensiblemente del entorno químico del núcleo. Esto se debe a que dependiendo del entorno químico, la densidad de los electrones y por lo tanto el campo magnético varían, y por ello los núcleos

de un mismo átomo en distintos compuestos presentan frecuencias de resonancia diferentes. Estas pequeñas diferencias de frecuencias de resonancia se denominan "*chemical shift*" (δ) y convencionalmente se representan expresadas en partes por millón o ppm (1 Hz por millón de Hz de la frecuencia del resonador). De esto se desprende que cuanto mayor es la potencia del equipo utilizado, éste será capaz de analizar rangos de diferencia más estrechos. De esta forma, los resultados experimentales obtenidos mediante ^{31}P -NMR se presentan en forma análoga a las de un cromatograma, con el parámetro δ (en ppm) como eje de coordenadas (ver **Figura 5.1**). Para una mayor profundización de estos fundamentos teóricos de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear se recomienda la lectura de Bovey (1972), Ewing (1975), y Pomeranz & Meloan (1978), además del resto de la bibliografía citada en esta sección.

La NMR es una técnica multifacética con gran variedad de aplicaciones que incluye la espectroscopía de alta resolución en estado sólido o líquido, imagen por resonancia magnética (MRI), estudios de relajación y estudios de difusión (Dais & Spyros, 2012). Estos métodos permiten el estudio de estructuras moleculares y el análisis cuali y cuantitativo tanto de compuestos puros como mezclas complejas. Si bien no todos los núcleos de átomos pueden medirse con NMR, pueden analizarse los núcleos ^1H , ^{13}C y ^{31}P , los que revisten gran importancia en el campo de la química orgánica, en especial de lípidos (Diehl, 2001).

La espectroscopía de NMR es una herramienta muy ventajosa para el análisis de sistemas multicomponentes, como es el caso de los alimentos. Esto se ve reflejado en el incremento de la implementación de esta metodología, tanto en la industria como en instituciones científicas o de análisis de alimentos. Avances tecnológicos recientes en la instrumentación

de NMR, como la disponibilidad de campos magnéticos de mayor potencia, han incrementado significativamente la sensibilidad del método (Dais & Spyros, 2012).

El desarrollo de métodos para el análisis de lecitinas mediante P-NMR surgió como una respuesta ante la demanda de una metodología de alta selectividad en la detección de las diferentes clases de PLs y LPLs presentes en lecitinas nativas e hidrolizadas, que no requiera tratamientos previos de separación y permitiera una eficiente identificación y cuantificación de los mismos (Cabezas, 2010). El poder de resolución de esta metodología es tan marcado que en un espectro se puede distinguir entre diferentes tipos de LPLs, según la posición en la que esté ubicado el ácido graso. Varios autores, han obtenido espectros de ^{31}P -NMR con señales diferentes para 1- y 2-lisofosfatidilcolina (1-LPC y 2-LPC), pudiendo realizar el seguimiento de reacciones de hidrólisis con enzimas con actividad PLA_1 , y llevar a cabo estudios de migración de ácidos grasos en estos LPLs (Diehl, 2001; MacKenzie y col., 2009a).

En la **Figura 5.1** se muestra un espectro correspondiente a lecitina de girasol hidrolizada, tomado de Cabezas y col. (2011). Estos autores reportan que para la hidrólisis se utilizó una fosfolipasa con actividad PLA_2 (Lecitase 10L), y los ensayos de P-NMR fueron llevados a cabo en “Spectral Service GmbH” (Colonia, Alemania).

Es importante tener en cuenta que para la cuantificación de compuestos por NMR, en el caso del ^{31}P es necesario evitar el efecto denominado “Overhauser” (*Nuclear Overhauser Enhancement*, NOE), que origina un cambio de intensidad debido al acoplamiento dipolar entre los núcleos de ^1H y ^{31}P , aumentando la señal observada. Este efecto puede interferir con el cálculo cuantitativo de las señales de interés, por lo que varios autores sugieren utilizar un desacoplamiento restringido inverso en la adquisición del espectro (*inverse gated*

decoupling), el cual desacopla los ^1H de ^{31}P durante la adquisición de datos (London & Feigenson, 1979; Braun y col., 1990; Spyros & Dais, 2009; Dais & Spyros, 2012)

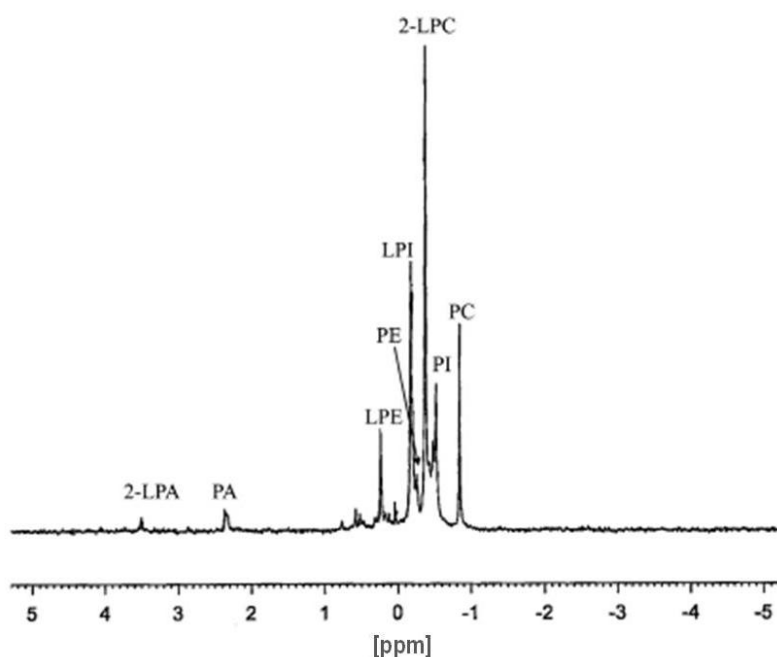


Figura 5.1. Espectro de ^{31}P -NMR correspondiente a lecitina de girasol hidrolizada utilizando PLA_2 (Cabezas y col., 2011).

El análisis cuantitativo por NMR es registrado en cantidades molares, presentando una relación lineal entre el área del pico (A) y la concentración molar del compuesto. Por ello, la cuantificación por esta metodología es muy sencilla, ya que conociendo la concentración molar del estándar interno (M_{IS} , mol/L), puede calcularse la concentración molar cada especie (M_{PL} , mol/L) como:

$$M_{PL} = \frac{A_{PL}}{A_{IS}} M_{IS} \quad (5.1)$$

Donde A_{PL} y A_{IS} son las áreas de pico de cada PL (LPL o GPL) y del estándar interno, respectivamente.

Luego conociendo la concentración de lecitina en la muestra (C_0 , g/L) puede determinarse la concentración molar de cada especie en la lecitina:

$$C_{PL}(\text{mol/g lecitina}) = \frac{M_{PL}}{C_0} \quad (5.2)$$

5.2. MATERIALES Y EQUIPAMIENTO

5.2.1. MATERIALES

Las características de la lecitina cruda de girasol y la enzima utilizada para su hidrólisis fueron descritas en el capítulo 3 (sección 3.1.1 y 3.1.2, respectivamente).

Para el estudio del sistema más adecuado para la preparación de las muestras se utilizaron deoxicolato sódico (Sigma-30970. Sigma-Aldrich, Italia), EDTA disódico (Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt dihydrate p.a. ACROS ORGANIC), y agua deuterada (D_2O , Deuterium oxide -Heavy water- 99,8 atom % D. ARMAR Chemicals, Suiza).

Como estándares internos para la cuantificación se utilizaron fosfato disódico (Na_2HPO_4 , Sigma, Italia) y N-fosfonometil glicina (PMG, $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$. Estándar analítico, pureza 99,8%. Monsanto Europe, N. V.).

Para la identificación de los compuestos se utilizaron patrones puros de fosfolípidos y lisofosfolípidos. La fosfatidiletanolamina (PE), ácido fosfatídico (PA), fosfoglicerol (PG) y

lisofosfatidilcolina (LPC) fueron de Coatsome NOF Corporation (Tokio, Japón). El fosfatidilinositol (PI) y lisofosfatidilinositol (LPI) fueron de Sigma (Italia). Para la identificación de fosfatidilcolina (PC) se utilizó Phospholipon 90G (lecitina de soja altamente purificada con al menos 90% PC, de Rhône-Poulenc, GmbH & Co., Colonia, Alemania). Los compuestos puros, o mezclas de composición conocida de las especies de interés, se usaron también para la verificación de la técnica desarrollada, para lo que se utilizó además fosfatidilcolina (PC) de NOF Corporation (Tokio, Japón). En la **Tabla 5.1** se detallan las características de los compuestos utilizados, indicando la marca, origen y grado de pureza.

5.2.2. EQUIPAMIENTO

Para la preparación de muestras se utilizó un sonicador Sonifier 250/450 (Branson Ultrasonics, Danbury, CT, Estados Unidos) y como agitadores se utilizaron un Shaker SM-30 (Edmund Bühler, Hechingen, Alemania) y un IKA-C-MAG HS 7 (Hot Plate Stirrer Ceramic Top. IKA, Alemania).

La determinación por ^{31}P -NMR se llevó a cabo en un equipo Bruker Avance 500 (500 MHz, Rheinstetten, Alemania), perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Gante, Bélgica. El equipo se operó a una frecuencia de ^{31}P de 202,46 MHz, utilizándose el ya mencionado modo de *“Inverse gate proton decoupling”* para la supresión del efecto NOE. La temperatura de las mediciones fue controlada dentro de un rango de +/- 0,01 °C con un controlador digital Eurotherm 3000 VT (Ashburn, VA, Estados Unidos). Se utilizó la siguiente configuración para la adquisición de datos: 65180 data points, pulso de excitación de 90°, y N° de escaneos: 256.

Para las mediciones de pH se utilizó un analizador electroquímico Consort C6020 (Consort, Bélgica).

Tabla 5.1. Características de los compuestos puros utilizados para la identificación de señales y verificación del método propuesto.

Características de los Compuestos Puros Comerciales de PLs y LPLs				
PL	Descripción	Marca	Origen	Pureza
PG	Diesteril-fosfoglicerol (MG-8080LS. DSPG-Na)	COATSOME. NOF Corp.	Fosfolípido sintético altamente purificado	99%
PE	Dipalmitilil-fosfatidiletanolamina (ME-6060. DPPE)	COATSOME. NOF Corp.	Fosfolípido sintético altamente purificado	99%
PA	Dipalmitilil-ácido fosfatídico (MA-6060LS. DPPA-Na)	COATSOME. NOF Corp.	Fosfolípido sintético altamente purificado	99%
LPC	Estearil-lisofosfatidilcolina (MC-80 H. S-LysoPC)	COATSOME. NOF Corp.	Fosfolípido sintético altamente purificado	99%
PI	L- α -Fosfatidilinositol de Glycine max (P6636) Contiene ácido fosfatídico y fosfatidiletanolamina	Sigma	Lecitina de Soja	50%
LPI	L- α -Lisofosfatidilinositol sal sódica de Glycine max Principalmente ác. palmítico y esteárico (L7635)	Sigma	Lecitina de Soja	96%
PC	Phospholipon 90G Lecitina de soja altamente purificada en fosfatidilcolina	Rhône- Poulenc	Lecitina de Soja	90%
	Diesteril-fosfatidilcolina (MC-8080.DSPC)	COATSOME. NOF Corp.	Fosfolípido sintético altamente purificado	99%

5.3. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA DETERMINACIÓN

5.3.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Los solventes reportados con mayor frecuencia para la preparación de muestras en la determinación de PLs mediante P-NMR son solventes orgánicos (o mezclas de ellos), siendo los más comunes el cloroformo y el metanol. Esto se debe a que la agregación de PLs en medio acuoso puede llevar a la obtención de picos muy anchos, lo que dificulta la identificación de los compuestos, pudiendo solaparse u obtenerse una misma señal para varios compuestos. Esta agregación de los PLs en medio acuoso se ve reflejada en la turbidez de las muestras, como puede observarse en las dispersiones de lecitinas en agua, que resultan en muestras opacas de color amarillo. Una alternativa para evitar esta agregación es el uso de sustancias detergentes, como las sales biliares, que ayudan a reducir la aglomeración de PLs formando micelas mixtas (Meneses & Glonek, 1988; Cheng y col., 1992; Puppato y col., 2007).

Debido a que las muestras provenientes de la hidrólisis enzimática realizada en esta tesis se encuentran en medio acuoso, se estudió la preparación de las mismas sin el uso de solventes orgánicos para evitar tratamientos previos que pueden sumar errores experimentales, además de incrementar el tiempo total de la determinación. Asimismo la implementación de un sistema orgánico implica el uso de solventes deuterados (los átomos de ^1H son sustituidos por ^2H o deuterio), cuyo costo es muy alto, mientras que en el caso de sistemas acuosos puede utilizarse sólo una fracción de agua deuterada (D_2O) en el total, reduciéndose los costos de la preparación de muestras (Henderson y col., 1974; London & Feigenson, 1979; Murcia & Villalain, 1993; Spyros & Dais, 2009).

Además, en el caso de muestras mixtas como son las lecitinas crudas, el uso de detergentes permite que tanto los lípidos polares como los no polares (TGs) se encuentren solubilizados, obteniéndose una muestra homogénea, sin la necesidad de separaciones previas, que como ya se dijo, pueden incrementar los errores experimentales en la determinación (MacKenzie y col., 2009b).

Para la elección del detergente a utilizar en las muestras, London & Feigenson (1979) sugieren que las sales sódicas de colato y deoxicolato disuelven más fácilmente los lípidos que otros detergentes comunes como el SDS o Triton X-100, obteniéndose muestras de PLs en agua con una buena transparencia para la determinación por NMR. Por ello, se realizaron ensayos preparando soluciones (o dispersiones) acuosas de deoxicolato y lecitina, estudiando la influencia de la concentración en la transparencia de la muestra resultante y en la resolución de los espectros obtenidos por NMR.

Otro factor que influye en la resolución de los espectros es la presencia de iones multivalentes como el Ca^{+2} . Varios autores (Henderson y col., 1974; Spyros & Dais, 2009) sugieren que la presencia de estos iones está asociada a la obtención de picos (señales) anchos en los espectros de P-NMR para muestras de fosfolípidos. Debido a que las muestras de lecitina utilizadas en esta tesis poseen un contenido natural considerable de iones Ca^{+2} (ver capítulo 3, Tabla 3.4), se estudió la influencia del agregado de EDTA como compuesto quelante en la resolución de los picos obtenidos por P-NMR.

Por otra parte, además de los aspectos mencionados, debió estudiarse la influencia del pH. Varios estudios demuestran que tanto el tipo y composición de los solvente (orgánico, acuoso, con detergentes, etc.), como la concentración de la muestra, la temperatura de medición y el pH, influyen en la frecuencia o *shift* (δ) del compuesto; esto es, que dependiendo de las condiciones de la muestra y temperatura de medición, se tienen

variaciones en los δ tanto para los analitos como para la sustancia de referencia (estándar interno), siendo el valor de pH el que tiene mayor influencia (Karaghiosoff, 2007). Por esto mismo, en el proceso de desarrollo del método, fue necesaria la utilización de sustancias puras para la identificación de los compuestos de interés ya que si bien existen datos en la literatura de los *shifts* de varios compuestos, éstos varían con las condiciones de determinación.

5.3.1.1. EFECTO DEL USO DE DETERGENTES

Como detergente para la preparación de muestras se eligió una sal sódica de deoxicolato (DC). En primer lugar se ensayó la influencia de la relación lecitina:deoxicolato en la transparencia de las muestras, para 2% y 4% (m/m) de lecitina cruda de girasol (nativa) y entre 0 y 10% DC (m/m).

Todas las muestras fueron preparadas alternando sonicación y agitación a 40 °C, para asegurar una buena disolución, según se describe en la literatura (London & Feigenson, 1979; Murcia & Villalain, 1993). Luego las muestras se dejaron descansar (sin agitación) a temperatura ambiente por 2 h, y se evaluó su turbidez visualmente, en comparación con una muestra patrón de lecitina disuelta en cloroformo (transparencia deseada). Para ello se preparó una muestra de lecitina cruda de girasol en cloroformo en igual concentración que las muestras a analizar.

En la **Tabla 5.2** se muestran los resultados obtenidos para los ensayos de turbidez. Se observó que en el rango estudiado, la concentración de lecitina no influye en la transparencia de las muestras.

Tabla 5.2. *Transparencia lograda en muestras de lecitina cruda de girasol en agua, según la cantidad de deoxicolato (DC) utilizada.*

% DC (m/m)	% Lecitina (m/m)	
	2%	4%
0	muy turbio	muy turbio
2	muy turbio	muy turbio
5	turbio	turbio
6	ligeramente turbio	ligeramente turbio
7	ligeramente turbio	ligeramente turbio
8	Transparente	Transparente
9	Transparente	Transparente
10	Transparente	Transparente

Por otra parte, es evidente que la concentración de DC influye notablemente en la transparencia, lo que también puede apreciarse en la **Figura 5.2**, donde se muestra una foto de los viales con lecitina de girasol y distintas concentraciones de DC.

Los viales de la foto contienen todos un buzo magnético para agitación en su interior, y puede observarse cómo, a medida que aumenta la concentración de DC, el buzo puede verse más claramente a través de la muestra.

Tanto en la tabla como en la figura, puede verse que hasta un 5% DC no se observan diferencias marcadas en la transparencia, obteniéndose muestras opacas a la vista; si bien la opacidad de la muestra con 5% es algo menor que para la muestra sin detergente (0%), no se consigue la transparencia deseada.

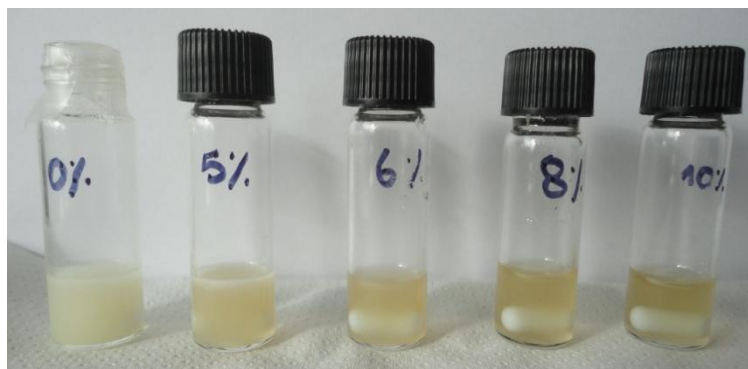


Figura 5.2. *Transparencia de muestras con 2% (m/m) lecitina y un contenido de deoxicolato de 0 a 10% (m/m), a temperatura ambiente.*

Asimismo, para las muestras donde la concentración de detergente utilizada fue de 6 y 7%, la transparencia es mayor, lo que queda reflejado en la imagen ya que a partir de esas concentraciones puede apreciarse el buzo agitador en el interior del vial (lo que no logra apreciarse para 0 y 5% DC). Por último, como se ve en la **Figura 5.2**, y queda reflejado en la tabla, utilizando concentraciones de 8 y 10% DC se obtienen muestras con la transparencia deseada.

5.3.1.2. EFECTO DEL AGREGADO DE NA-EDTA

Una vez estipulada la concentración de DC, se siguió con el estudio de la influencia de la presencia de EDTA en las muestras, analizando los espectros obtenidos con y sin el agregado de este compuesto.

Para ello se prepararon muestras con lecitina cruda de girasol, lecitina de soja purificada (90% PC) y LPC pura, todas a una concentración del 2% (m/m). En todos los casos se disolvió la muestra en solución acuosa al 10% DC y 2 mM Na-EDTA. En la **Figura 5.3** se muestran los

espectros obtenidos mediante P-NMR, para lecitina cruda de girasol con y sin el agregado de EDTA (A y B, respectivamente).

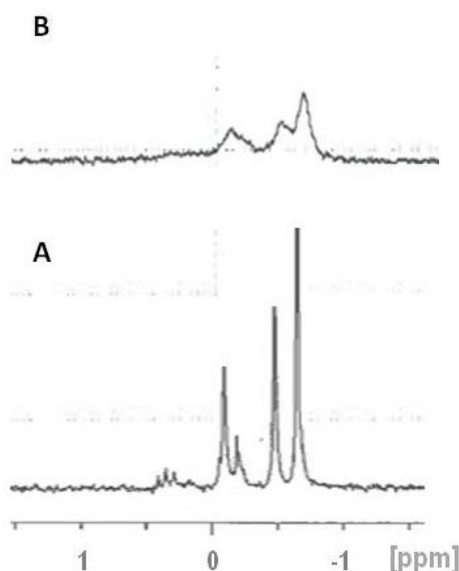


Figura 5.3. Comparación de espectros obtenidos por ^{31}P -NMR para muestras de lecitina cruda nativa de girasol, con **(A)** y sin **(B)** el agregado de Na-EDTA, a idénticas concentraciones de lecitina.

Las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura de 40 °C, y las especificaciones del equipo de espectroscopía para la medición y adquisición de datos son las mismas para todos los ensayos descritos en este capítulo. Estas se detallan en la sección 5.2.2 (Equipamiento) y luego junto con el resto de las especificaciones del método, en la **Tabla 5.3**.

Puede observarse que el agregado de EDTA en las muestras es indispensable para lograr una buena resolución de los picos, facilitando la identificación y cuantificación de las especies de interés. Esto mismo no fue tan evidente en las muestras de lecitina de soja, hidrolizada y sin hidrolizar, y aún menos en las muestras correspondientes a los compuestos puros. Este hecho puede deberse a que el contenido de calcio en la lecitina de girasol es más alto que en

la de soja, por lo que se hace necesaria la utilización del compuesto con capacidad quelante de metales multivalentes para obtener espectros con buena resolución.

Por otra parte, durante la determinación por P-NMR se observó que las muestras conteniendo EDTA luego de un tiempo comenzaban a desestabilizarse hasta presentar precipitados en los viales y en los tubos de NMR. Por este motivo, las muestras se prepararon en el momento del análisis y fueron mantenidas en un baño a 40 °C asegurando así la completa solubilidad y transparencia necesaria para la medición y evitando este proceso de desestabilización.

De todas formas, se consideró que ésta no era la manera más confiable ni práctica para la determinación analítica. En consecuencia, se decidió estudiar otra posible solución al problema de la desestabilización.

Si bien este comportamiento no deseado sólo se observó en las muestras con EDTA, para descartar que el DC sea el compuesto que precipita en las muestras a temperatura ambiente, se decidió evaluar la estabilidad de este compuesto en soluciones acuosas a distintas temperaturas. Para ello, se realizó un ensayo de densitometría en una solución acuosa de DC al 10% (m/m), utilizando un densitómetro DMA 5000M (Anton Paar, Austria). En la **Figura 5.4** puede observarse que la densidad aumenta de manera continua con el descenso de la temperatura, sin presentar saltos que indicarían la formación de un precipitado en la muestra. Esto sugiere que el deoxicolato, en la máxima concentración utilizada (10% m/m), se mantiene en solución en el rango de temperaturas estudiado.

Luego, se prepararon muestras con menores concentraciones de EDTA (0,5 y 1 mM) para comprobar si esto mejoraba su estabilidad, pero se obtuvieron los mismos resultados, con formación de precipitados luego de cierto tiempo a temperatura ambiente.

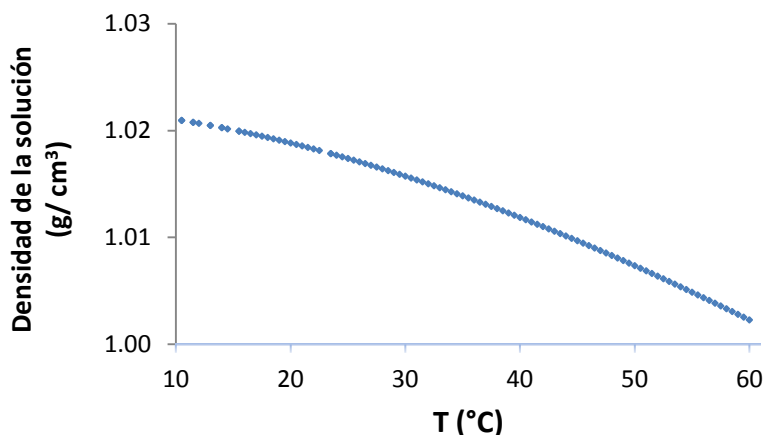


Figura 5.4. Densitometría de una solución acuosa de deoxicolato al 10% (m/m), en un rango de temperaturas de 10 a 60 °C.

Algunos autores sugieren que la solubilidad del EDTA en soluciones acuosas varía según el pH, reportando que a pHs menores a 7 disminuye significativamente, formando precipitados (MacKenzie y col., 2009b). Por ello se realizaron estudios de solubilidad y estabilidad de las muestras a temperatura ambiente, a diferentes valores de pH. Se prepararon muestras similares a las del ensayo anterior (10% DC, 2% lecitina; m/m), con 1 y 2 mM de Na-EDTA, a temperatura ambiente, con valores de pH de 6, 7, 8 y 9. El pH de las muestras se ajustó con NaOH o HCl 0,1 N según fuese necesario. Las muestras, como en todos los ensayos, fueron preparadas alternando sonicación y agitación a 40 °C. Luego se dejaron descansar (sin agitación) a temperatura ambiente por 12 h, y se evaluó su estabilidad. Los resultados confirmaron la baja solubilidad del Na-EDTA en las muestras a pH=6, e incluso a pH=7, observándose la formación de precipitados para las dos concentraciones utilizadas del compuesto quelante. Por el contrario, las muestras con 1 mM y 2 mM de Na-EDTA a pH=8 y 9, se mantuvieron claras y estables, sin presencia de precipitados, lo que confirmó que si se trabaja a $\text{pH} \geq 8$ no es necesario disminuir el contenido de Na-EDTA en las muestras y puede mantenerse la concentración inicialmente propuesta de 2 mM.

En conclusión, se decidió preparar todas las muestras para las determinaciones de fosfoglicéridos por espectroscopía de P-NMR con una concentración 2 mM de Na-EDTA y ajustar el pH de todas ellas a un valor de 8, utilizando NaOH 0,1 N.

5.3.1.3. ELECCIÓN DEL ESTÁNDAR INTERNO PARA LA CUANTIFICACIÓN

En base a una búsqueda bibliográfica se decidió probar con dos compuestos diferentes para elegir el que presentara mejor performance en los espectros de P-NMR. Es muy común el uso de P inorgánico como estándar para espectroscopía de NMR de fósforo, siendo el ácido fosfórico (H_3PO_4) y sus sales sódicas (Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4) los más comúnmente utilizados (Henderson y col., 1974; Murcia & Villalain, 1993; Turner, 2002). Por otra parte, en los últimos años se ha implementado el uso de la N-fosfonometil glicina o PMG ($\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$), como estándar interno en la determinación de PLs por P-NMR, mostrando muy buenos resultados (Süllentrop y col., 2002; MacKenzie y col., 2009b; Vyssotski col., 2009).

Se ensayaron determinaciones de lecitina cruda de girasol (2% m/m) y lecitina de soja altamente purificada (90% PC), en solución de 10% DC (m/m) y 2 mM EDTA, utilizando fosfato disódico y PMG (ver sección 5.2.1 materiales) como estándares internos con una concentración de 5 mM, y se evaluó la resolución de sus señales. En la **Figura 5.5** se muestran los espectros correspondientes a muestras de lecitinas de girasol con ambos estándares. Todas las determinaciones fueron realizadas según las especificaciones descritas en la **Tabla 5.3**.

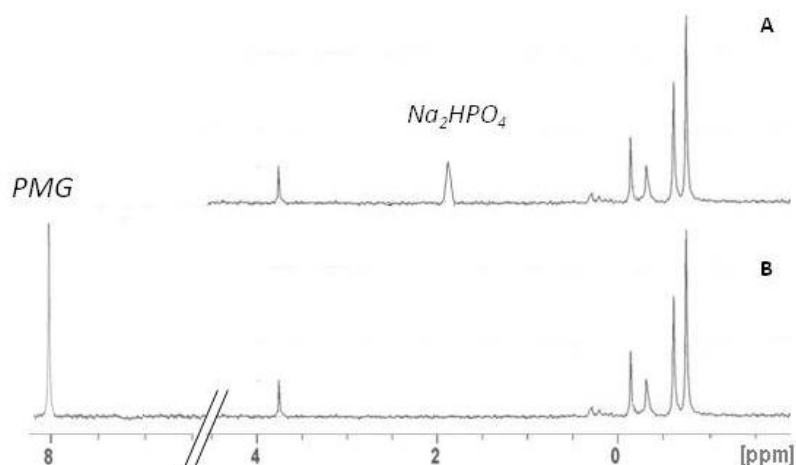


Figura 5.5. Espectros de ^{31}P -NMR de muestras de lecitina cruda de girasol (nativa) con (A) fosfato disódico (Na_2HPO_4), y (B) N-fosfonometil glicina (PMG) como estándares internos para la cuantificación.

El fosfato disódico mostró señales con menor resolución, presentando picos anchos, y con leves corrimientos de δ . Por el contrario el PMG mostró señales bien angostas y uniformes en todas las muestras. Esto concuerda con lo reportado por algunos autores, que sugieren la utilización de estándares diferentes al ácido fosfórico (y su sales sódicas), debido a que en ciertas ocasiones suele presentar señales poco resueltas con anchos de pico variables (Karaghiosoff, 2007). En conclusión, se seleccionó el PMG como estándar más adecuado.

5.3.1.4. INFLUENCIA DEL pH

Debido a que la región del espectro en la que aparecen las resonancias de la mayoría de los PLs es pequeña (de -1 a 1 ppm, salvo PA, LPA y GPA), y debido a la dependencia de éstas con el pH, pueden tenerse variaciones en los δ , conduciendo a errores en la identificación, e incluso la obtención de señales mal resueltas o solapadas, lo que conlleva a errores en la cuantificación de las especies (Yoza y col., 1994; Karaghiosoff, 2007)

Por ello, con las condiciones para la preparación de la muestra ya establecidas, se realizó un estudio de la sensibilidad a pequeñas variaciones de pH en las frecuencias de resonancia ("shifts", δ) de los compuestos.

Se prepararon muestras de lecitina cruda de girasol, (10% DC, 2Mm EDTA) con PMG como estándar interno y con valores de pH entre 7 y 9, ajustado con NaOH 0,1 N.

Pudo observarse que cambios pequeños en el pH originaban movimientos en los δ de algunas especies. El efecto más marcado se observó en el PMG (estándar), PA, PE y PG, lo que concuerda con lo reportado por varios autores (Puppato y col., 2007).

Sin embargo a pH=8 se observaron picos bien resueltos, pudiendo ser identificados e integrados por separado, por lo que se decidió realizar las mediciones a ese valor de pH.

Es importante destacar, que debido a la influencia observada con pequeñas variaciones en el pH, este valor fue ajustado en las muestras con una precisión de $\pm 0,2$.

5.3.2. CONDICIONES ÓPTIMAS RECOMENDADAS

A partir de los resultados obtenidos en todos los estudios realizados se decidió fijar las condiciones para la muestra en: 10% DC, 2mM Na-EDTA, 2% lecitina (m/m) y pH=8. Para la cuantificación se eligió trabajar con 5mM de PMG como estándar interno. En la **Tabla 5.3** se resumen estas condiciones y las especificaciones finales para el método propuesto de determinación de fosfoglicéridos en lecitina cruda de girasol, nativa y modificada, mediante P-NMR.

Tabla 5.3. Especificaciones para la preparación de muestra, equipo a utilizar y parámetros utilizados en la medición, para el método propuesto de determinación de fosfolípidos y sus formas hidrolizadas mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de fósforo.

Especificaciones del Método Propuesto para Determinación de PL, LPL y GPL por ^{31}P-NMR		
Composición de la muestra	Na-EDTA	2 mM
	Lecitina de Girasol	2 % (m/m)
	Deoxicolato de sodio	10 % (m/m)
	PMG	5 mM
	pH	8
Especificaciones del Equipo	Equipo	Bruker Avance 500 (Rheinstetten, Alemania)
	Frecuencia de operación de ^{31}P	202,46 MHz
	Sonda BBI	5 mm
Especificaciones para la Medición	Desacoplamiento restringido inverso	Sí
	Temperatura	40 °C
	Puntos de toma de datos (<i>data points</i>)	6518
	Pulso de excitación	90°
	Número de escaneos	256
	Tiempo de relajación	12,25 s
	Tiempo de adquisición	3,22 s

5.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LA LECITINA

CRUDA DE GIRASOL Y SUS MUESTRAS HIDROLIZADAS

Para la identificación de todos los picos se utilizaron compuestos comerciales puros o mezclas comerciales de composición conocida. Las muestras se prepararon siguiendo las especificaciones del método propuesto mencionadas en el inciso anterior (**Tabla 5.3**). Para lograr la correcta identificación de los compuestos correspondientes a todas las especies de fosfolípidos, lisofosfolípidos y glicerofosfolípidos intervinientes en la reacción de hidrólisis, se eligieron como muestras representativas la lecitina cruda de girasol nativa y modificada mediante hidrólisis, con tiempos de reacción de 20 min y 24 h. De este modo, se aseguraba que tanto los PL, LPLs (productos intermedios) como los GPLs (productos de hidrólisis total) estuvieran presentes en al menos una de las muestras y sus picos aparecieran en los espectros.

Se utilizaron los compuestos comerciales disponibles en el laboratorio, o que pudieron adquirirse para este fin (PC, PE, PA, PG, PI, LPC y LPI). Como no se contaba con disponibilidad de compuestos de referencia para varias especies (LPE, LPA, LPG, y todos los glicerofosfolípidos), los fosfolípidos comerciales fueron hidrolizados en las mismas condiciones que la lecitina, obteniéndose mezclas de cada uno con sus correspondientes lisofosfolípidos y glicerofosfolípidos.

En la **Figura 5.6**. se muestran los espectros correspondientes a LPC pura (C18-LisoPC) y una muestra de hidrólisis de PC. Puede observarse un pico extra en la muestra de PC hidrolizada, que se atribuye a la forma más hidrolizada del compuesto, la glicerofosfatidilcolina (GPC), producto de hidrólisis de la 2-LPC. Cabe destacar cómo este método de identificación logró distinguir entre las dos formas de LPC, según la posición en la que se encuentre el ácido

graso (AG). La nomenclatura indica que la 1-LPC fue hidrolizada en la posición 1 quedando un AG esterificado en la posición 2, como sucede en el caso de utilizar Lecitase® Ultra, enzima con actividad PLA_1 . Por el contrario, la 2-LPC presenta un AG esterificado en la posición 1 por lo que puede ser hidrolizado nuevamente por la enzima Lecitase® Ultra para dar GPC, la forma más hidrolizada del compuesto, sin AGs.

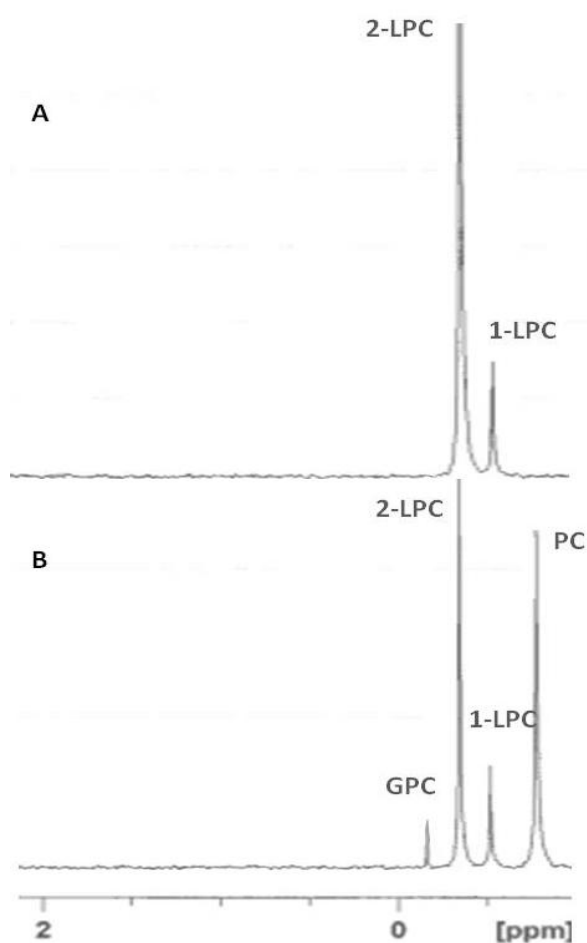


Figura 5.6. Espectros de ^{31}P -NMR correspondientes a muestras comerciales de C-18-Lisofosfatidilcolina (A), y fosfatidilcolina (B), esta última hidrolizada con Lecitase® Ultra.

De esta manera, se fueron identificando los picos correspondientes a los LPLs y GPLs de los que no se disponía del estándar correspondiente.

Para el resto de los compuestos, sólo fue posible la identificación de 1 pico para los LPL, no pudiéndose distinguir entre la forma 1- y 2- del resto de los LPLs, como fue destacado en el caso de la LPC. De todas formas en bibliografía sólo se encontró algunos autores que reportan la capacidad de algunos métodos de ^{31}P -NMR para la identificación de estas dos señales de 1-LPC y 2-LPC, pero no así con el resto de los LPL (Diehl, 2001; MacKenzie y col., 2009a).

Cabe destacar que los AG de los LPLs (para todas las especies) pueden migrar de una a otra posición, obteniéndose un equilibrio entre los dos tipos de LPL (1- y 2-LPL). Este proceso se conoce como acil migración (o migración de acilo) y depende de varios factores como temperatura, pH y tipo de LPL, siendo termodinámicamente más estable la forma 2-LPL. La acil migración es la causa más probable por la que se tiene hidrólisis total de PL (obtención de GPL) en la modificación enzimática de lecitina de girasol llevada a cabo en esta tesis, utilizando Lecitase® Ultra, por lo que se discutirá en detalle más adelante.

En la **Figura 5.7** se muestran los espectros correspondientes a lecitina cruda de girasol nativa y modificada por hidrólisis, con tiempos de reacción de 20 min y 24 h, indicando a qué especie corresponde cada pico.

En la figura puede verse cómo para la muestra de lecitina nativa (A) se ven principalmente fosfolípidos (PC, PI, PE, PA y PG). En las muestras hidrolizadas por 20 min (B) se ven todas las señales correspondientes a los lisofosfolípidos (LPC, LPI, LPE, LPA y LPG) y a tiempos largos de reacción (24 h) pudieron identificarse todos los picos de glicerofosfolípidos (GPC, GPI, GPE, GPG, GPA).

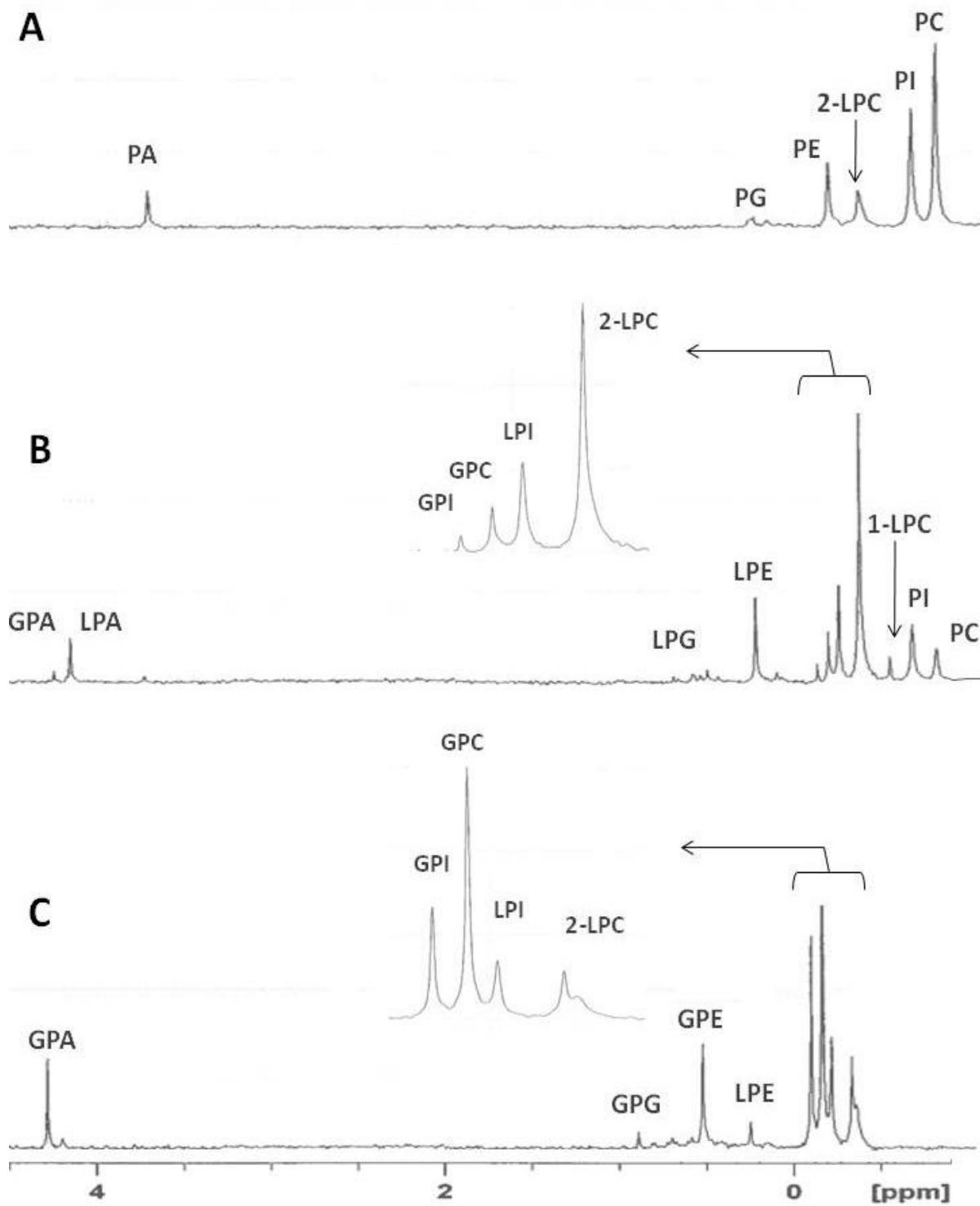


Figura 5.7. Espectros de resonancia magnética nuclear de fósforo (^{31}P -NMR) para lecitina cruda de girasol (A), y sus muestras hidrolizadas para 20 min (B) y 24 h de reacción (C).

Otro aspecto importante que se tuvo en cuenta a la hora de esclarecer la identidad de las señales en los productos comerciales hidrolizados, y en las muestras de lecitina modificada, es que las especies de LPLs siempre tienen resonancias más grandes (o más positivas) que sus correspondientes PL. Es decir la señal en el espectro de un LPL, siempre estará a la izquierda de la del PL de la misma especie. Lo mismo ocurre con los GPL, cuyos δ serán siempre más positivos que los de su LPL correspondiente, presentándose a la izquierda en el espectro. Algunos autores incluso sugieren que las diferencias en las resonancias ($\Delta\delta$) entre cada PL y su correspondiente LPL, son similares. Puppato y col. (2007) encontraron por ejemplo, que la diferencia en las resonancias entre PG-LPG presentaban un valor ($\Delta\delta$) de 0,39 ppm y para PA-LPA un $\Delta\delta = 0,46$ ppm. En la **Figura 5.8** se muestra el espectro reportado por estos autores, donde se aprecia la similitud entre las diferencias de resonancias ($\Delta\delta$) de diferentes PLs con sus respectivos LPLs.

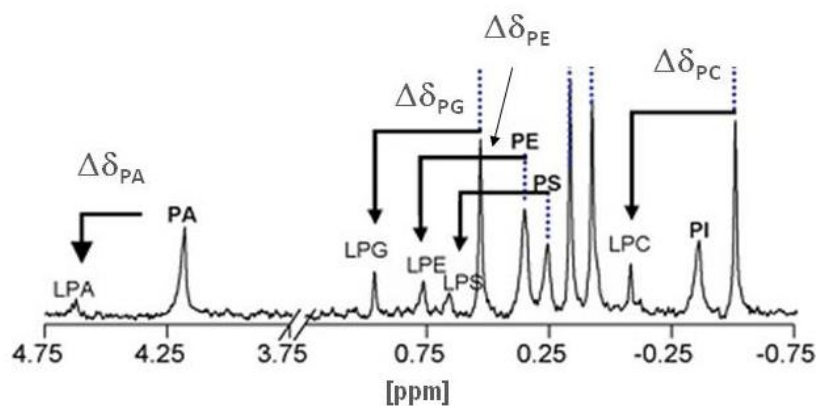


Figura 5.8. Espectro de ^{31}P NMR de una mezcla de PLs a pH 10,6, mostrando las diferencias de resonancias entre los PLs y sus correspondientes LPLs. Tomado de Puppato y col. (2007).

En los espectros obtenidos en esta tesis, pudo observarse un comportamiento similar de las señales de LPLs respecto de sus correspondientes PLs. En la **Tabla 5.4** se muestran los valores de $\Delta\delta$ para las distintas especies de PLs, obtenidos según las especificaciones detalladas en la **Tabla 5.3**.

Tabla 5.4. Diferencia de resonancia ($\Delta\delta$) entre las distintas especies de PLs y su correspondiente LPL.

	PC-LPC	PI-LPI	PE-LPE	PG-LPG	PA-LPA
$\Delta\delta$ (ppm)	0.44	0.44	0.41	0.40	0.44

Puede verse que los valores encontrados para las diferencias de resonancia ($\Delta\delta$) son similares entre sí para todos los pares de PL-LPL, coincidiendo también con lo encontrado por Puppato y col (2007) quienes como ya se mencionó, reportaron valores de alrededor de 0,4. De esta manera, podría afirmarse que si bien los valores de resonancia de las distintas especies dependen de las condiciones de determinación (pH, temperatura, solvente, etc.) las diferencias entre los valores de δ para un PL y su correspondiente forma hidrolizada se mantendrían dentro de un valor constante.

5.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para la validación del método cuantitativo, se prepararon muestras de concentración conocida de fosfolípidos, a partir de compuestos puros o mezclas de composición conocida.

Para ello se utilizaron compuestos comerciales de PC, PI, PE, PA, PG, LPC y LPI.

Las muestras para la determinación cuantitativa por ^{31}P -NMR se prepararon de manera idéntica a las muestras de lecitina, con 10% (m/m) DC, 2mM EDTA y a pH=8. Las cantidades utilizadas fueron similares a las identificadas en las muestras de lecitina, según sea el fosfolípido o lisofosfolípido, teniendo en cuenta el grado de pureza del producto. Las determinaciones se realizaron como se detalla en la **Tabla 5.3**, y se llevaron a cabo por duplicado.

En la **Tabla 5.5** se muestra la pureza determinada experimentalmente para cada compuesto, en comparación con el grado de pureza informado por el proveedor (Valor teórico, V_T).

Analizando el error relativo puede verse que para la mayoría de los compuestos se obtienen determinaciones con por lo menos 98% de exactitud, comparando con el valor declarado.

Además, como no se contaba con compuestos comerciales de algunos lisofosfolípidos (LPA, LPG), y tampoco de glicerofosfolípidos, para verificar la cuantificación de estos compuestos de interés se prepararon muestras de composición conocida de cada PL y se hidrolizaron con la intención de obtener mezclas de PL+LPL+GPL para todas las especies.

Tabla 5.5. Comparación entre la pureza de muestras comerciales (V_T) y la determinada experimentalmente, a partir de muestras de concentración conocida de PLs y LPLs

Especie	Pureza del Compuesto (% m/m)			
	V_T^a	Determinada por ^{31}P -NMR ^b	CV% ^c	Error Relativo ^d (%)
PC	99	97,92	0,68	1,09
PI	50	48,39	1,07	3,22
PE	99	97,60	1,18	1,41
PA	99	97,33	1,32	1,69
PG	99	96,09	1,51	2,94
LPC	99	97,95	0,71	1,06
LPI	96	94,38	0,87	1,69

^a V_T : Valor teórico informado por el proveedor.

^b Media aritmética, $n = 2$.

^c CV%: Coeficiente de variación de los valores determinados por NMR.

^d $E_R\% = (V_T - \text{Valor medio experimental})/V_T * 100$.

La hidrólisis se llevó a cabo en las mismas condiciones que las muestras de lecitina de girasol, descritas en el capítulo 4. Esto no sólo permitió la identificación de los picos para los compuestos sin estándares disponibles, como ya se explicó en una sección anterior, sino también la verificación de la validez de su cuantificación por este método.

La verificación de la cuantificación de estos compuestos se realizó de la siguiente manera:

Si se considera la reacción de hidrólisis (**Figura 5.9**), por cada *mol* de PL en la muestra luego de la reacción se tendrá una mezcla de *x moles* de PL + *y moles* de LPL + *z moles* de GPL dependiendo del avance de la reacción, cuyas cantidades siempre sumarán 1 mol.

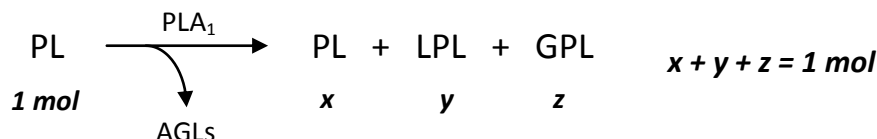


Figura 5.9. Reacción de hidrólisis de fosfolípidos (PLs) utilizando Lecitase® Ultra (PLA₁)

Considerando esta conservación de la cantidad de moles, desde el punto de vista teórico se verifica que $x + y + z$ es igual a la concentración molar de PL presente en la muestra original (sin hidrolizar). Luego, se verificó en las muestras de PLs comerciales de concentración molar conocida, que la suma de todas las especies hidrolizadas y sin hidrolizar, se mantenga constante luego de la hidrólisis. Para ello se determinó la composición molar de todas las especies encontradas en cada muestra hidrolizada, y se calculó el error relativo con respecto al contenido molar inicial del PL en la muestra sin hidrolizar, según la siguiente fórmula:

$$E_C\% = \left[1 - \frac{(M_{PL} + M_{LPL} + M_{GPL})_{Exp}}{M_{PL}^0} \right] \times 100 \quad (5.3)$$

Donde $(M_{PL} + M_{LPL} + M_{GPL})_{Exp}$ es la suma de las concentraciones molares determinadas experimentalmente por NMR en la muestra hidrolizada, y M_{PL}^0 la concentración molar en la muestra original calculada a partir de la pureza informada y el peso molecular de cada PL.

En la **Tabla 5.6.** se muestran los porcentajes calculados con respecto al valor teórico (obtenido en base a la pureza declarada en el producto), para todas las especies estudiadas.

Puede verse que los $E_C\%$ obtenidos fueron en general menores al 3%. El valor más alto fue obtenido para el PI, pero en este caso la pureza informada por el proveedor se trata de un valor aproximado.

Con todo esto, se verifica que el método es adecuado no sólo para identificar todas las formas hidrolizadas de los fosfolípidos presentes en las muestras, sino también para su cuantificación.

Tabla 5.6. Error relativo en la cuantificación por ^{31}P -NMR de PL, LPL, y GPL a partir de muestras comerciales de concentración conocida sometidas a hidrólisis enzimática con Lecitase® Ultra.

Error en la cuantificación por ^{31}P -NMR de muestras hidrolizadas	
Especie	E _c %
<i>PC</i>	1,15
<i>PI</i>	4,38
<i>PE</i>	1,67
<i>PA</i>	2,44
<i>PG</i>	2,99

Luego, mediante este método, es posible la determinación cuali-cuantitativa del contenido de fosfoglicéridos presentes en la lecitina cruda de girasol nativa e hidrolizada obtenida en esta tesis. De esta manera puede realizarse el seguimiento de los productos de hidrólisis de PLs, lo que permite no sólo evaluar la cinética de reacción, sino también caracterizar las lecitinas modificadas. En el siguiente capítulo (capítulo 6) se muestran y discuten los resultados de esta caracterización.

5.6. CONCLUSIONES

La metodología de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de fósforo, demostró ser adecuada para la determinación de fosfolípidos y sus productos de hidrólisis en lecitina cruda de girasol.

El método desarrollado presentó la ventaja de permitir la identificación de todos los lisofosfolípidos presentes en las muestras, y también de los glicerofosfolípidos, lo que permite el seguimiento de la hidrólisis de los lisofosfolípidos que son los compuestos de mayor interés en las lecitinas modificadas.

Con esta técnica puede realizarse el seguimiento de las distintas especies en los productos de hidrólisis de lecitina, evaluando en qué momento conviene detener la reacción, según las características deseadas en el producto final.

Además, si bien en el grupo de alimentos de PLAPIQUI no se cuenta con un equipo de espectroscopía de resonancia magnética nuclear, sí se cuenta con la disponibilidad de un equipo de NMR de líquidos en el Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur, por lo que es un método factible para permitir la determinación de estos compuestos en trabajos futuros realizados por el grupo.

5.7. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Algunos detalles de la metodología presentada en este capítulo fueron publicados en los siguientes trabajos:

5.7.1. PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS:

“Effect of hydrolyzed sunflower lecithin on the heat-induced coagulation of recombined concentrated milk emulsions”. Kasinos, M; **Goñi, M. L**; Nguyen, M. T; Sabatino, P; Martins, J. C; Dewettinck, K; Van der Meeren, P.

Artículo original; International Dairy Journal; 2014. Vol 38; p 187-194.

5.7.2. PRESENTACIONES EN CONGRESOS

“Determinación de fosfoglicéridos en lecitina de girasol mediante ^{31}P -NMR. Desarrollo de una técnica analítica”. **Goñi ML**, Constenla DT, Van der meeren P, Carelli AA.

Trabajo presentado como Póster y Trabajo completo en el V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2014). Noviembre 2014, Córdoba, Argentina.

“Effect of hydrolyzed sunflower lecithin on the heat-induced coagulation of recombined evaporated milk emulsions”. Kasinos, M; **Goñi, ML**; Sabatino, P; Van der Meeren, P.

Poster presentado en 8th NIZO Dairy Conference, “Functional Enzymes for Dairy Applications”. Septiembre de 2013, Papendal, Países Bajos.

5.8. BIBLIOGRAFÍA

- AOCS. (2003).** *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*. AOCS Press, Champaign.
- Baeza Jiménez, R. (2013).** *Desarrollo de Procesos Enzimáticos Selectivos para Aplicaciones Nutricionales*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Bovey, F. A. (1972).** Capítulo 1: Fundamentals of Nuclear Magnetic Resonance. En *High Resolution NMR of Macromolecules* (pp. 1–52). Academic Press, New York.
- Braun, S., Kalinowski, H. O., & Berger, S. (1990).** *100 and More Basic NMR Experiments*. VCH, New York.
- Bünger, H., & Pison, U. (1995).** Quantitative analysis of pulmonary surfactant phospholipids by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 672(1), 25–31.
- Cabezas, D. M. (2010).** *Modificaciones Tecnológicas de Lecitinas de Girasol. Aplicaciones en el Área Alimentaria*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Cabezas, D. M., Madoery, R., Diehl, B. W. K., & Tomás, M. C. (2011).** Application of enzymatic hydrolysis on sunflower lecithin using a pancreatic PLA2. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 443–446.
- Cheng, Y., Ho, D. M., Gottlieb, C. R., Kahne, D., & Bruck, M. A. (1992).** Facial amphiphiles. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 114(13), 7319–7320.
- Dais, P., & Spyros, A. (2012).** Capítulo 4: Nuclear Magnetic Resonance. En *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications* (pp. 91–115). Academic Press, Waltham.
- Diehl, B. W. K. (2001).** High resolution NMR spectroscopy. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103, 830–834.
- Ekroos, K., Chernushevich, I. V, Simons, K., & Shevchenko, A. (2002).** Quantitative profiling of phospholipids by multiple precursor ion scanning on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 74(5), 941–9.
- Ewing, G. W. (1975).** Capítulo 12: Magnetic Resonance Spectroscopy. En *Instrumental Methods of Chemical Analysis* (4th ed., pp. 239–261). McGraw-Hill, Inc., New York.

- Frank, A. W. (2013).** Capítulo 4: Phospholipids. En *Chemistry of Plant Phosphorus Compounds* (Vol. 2, pp. 159–304). Elsevier, Inc., Waltham.
- Guiotto, E. N. (2014).** *Aplicación de Subproductos de Chía (Salvia hispanica L.) y Girasol (Helianthus annuus L.) en Alimentos*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Henderson, T. O., Glonek, T., & Myers, T. C. (1974).** Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy of phospholipids. *Biochemistry*, 13(3), 623–8.
- Karaghiosoff, K. (2007).** Phosphorus-31 NMR. En *Encyclopedia of Magnetic Resonance* (pp. 1–7). John Wiley & Sons, Ltd., Oxford.
- Kiełbowicz, G., Smuga, D., Gładkowski, W., Chojnacka, A., & Wawrzenczyk, C. (2012).** An LC method for the analysis of phosphatidylcholine hydrolysis products and its application to the monitoring of the acyl migration process. *Talanta*, 94, 22–29.
- Lee, S. J., Choi, J. Y., Park, S., Chung, J. Il, Jin, J. S., Lee, S. J., Sung, N., Bae, D. W., Shin, S. C. (2010).** Determination of phospholipids in soybean (*Glycine max* (L.) Merr) cultivars by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(4), 314–318.
- London, E., & Feigenson, G. W. (1979).** Phosphorus NMR analysis of phospholipids in detergents. *Journal of Lipid Research*, 20(3), 408–12.
- Luquain, C., Laugier, C., Lagarde, M., & Pageaux, J. F. (2001).** High-performance liquid chromatography determination of bis(monoacylglycerol) phosphate and other lysophospholipids. *Analytical Biochemistry*, 296, 41–48.
- MacKenzie, A., Scott, D., Imamura, S., & Yazawa, K. (2009a).** Determination of phospholipase positional and substrate selectivities using ^{31}P -NMR. *Industrial Research*, 91, 22.
- MacKenzie, A., Vyssotski, M., & Nekrasov, E. (2009b).** Quantitative analysis of dairy phospholipids by ^{31}P NMR. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(8), 757–763.
- Meneses, P., & Glonek, T. (1988).** High resolution ^{31}P NMR of extracted phospholipids. *Journal of Lipid Research*, 29, 679–689.

- Moreau, R. A. (2004).** Capítulo 7: Quantitative Analysis of Lipids by HPLC. En *Lipid Chromatographic Analysis* (pp. 251–272). Marcel Dekker Inc., New York.
- Murcia, M. A., & Villalain, J. (1993).** Phospholipid Composition of Canned Peas by ^{31}P -NMR. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *61*, 345–347.
- Myher, J. J., & Kuksis, a. (1995).** General strategies in chromatographic analysis of lipids. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Applications*, *671*(1-2), 3–33.
- Nguyen, M. T., Van de Walle, D., Petit, C., Beheydt, B., Depypere, F., & Dewettinck, K. (2014).** Mapping the Chemical Variability of Vegetable Lecithins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *91*(7), 1093–1101.
- Pan, L. G., Buedo, A., Tomás, M. C., Calvelo, A. & Añon, M. C. (2003).** Obtención, acondicionamiento y caracterización de lecitinas de girasol. En *2do. Congreso Argentino de Girasol*. Buenos Aires: ASAGIR. Consultado en: www.asagir.org.ar/asagir2008 (último acceso 07/2014)
- Penci, M. C. (2009).** *Modificación Enzimática de Lecitinas*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur, Argentina.
- Peterson, B. L., & Cummings, B. S. (2006).** A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples. *Biomedical Chromatography: BMC*, *20*(3), 227–43.
- Pomeranz, Y., & Meloan, C. F. (1978).** Capítulo 18: Nuclear Magnetic Resonance. En *Food Analysis: Theory and Practice* (pp. 233–241). AVI Publishing Company, Inc., Westport.
- Puppato, A., DuPré, D. B., Stolowich, N., & Yappert, M. C. (2007).** Effect of temperature and pH on ^{31}P nuclear magnetic resonances of phospholipids in cholate micelles. *Chemistry and Physics of Lipids*, *150*(2), 176–85.
- Sotirhos, N., Herslöf, B., & Kenne, L. (1986).** Quantitative analysis of phospholipids by ^{31}P -NMR. *Journal of Lipid Research*, *27*(4), 386–92.
- Spyros, a., & Dais, P. (2009).** ^{31}P NMR spectroscopy in food analysis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, *54*(3-4), 195–207.
- Süllentrop, F., Moka, D., Neubauer, S., Haupt, G., Engelmann, U., Hahn, J., & Schicha, H. (2002).** ^{31}P -NMR spectroscopy of blood plasma: determination and quantification of

phospholipid classes in patients with renal cell carcinoma. *NMR in Biomedicine*, 15(1), 60–68.

Turner, B. L. (2002). Optimizing phosphorus characterization in animal manures by solution phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Environmental Quality*, 33(2), 757–66.

Van Nieuwenhuyzen, W., & Tomás, M. C. (2008). Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(5), 472–486.

Vyssotski, M., MacKenzie, A., & Scott, D. (2009). TLC and ^{31}P -NMR analysis of low polarity phospholipids. *Lipids*, 44(4), 381–389.

Yoza, N., Ueda, N., & Nakashima, S. (1994). pH-dependence of ^{31}P -NMR spectroscopic parameters of monofluorophosphate, phosphate, hypophosphate, phosphonate, phosphinate and their dimers and trimers. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 348(10), 633–638.

CAPÍTULO VI:
SEGUIMIENTO DE
FOSFOGLICÉRIDOS
EN LA HIDRÓLISIS
MEDIANTE ^{31}P -NMR.

6. SEGUIMIENTO DE FOSFOGLICÉRIDOS EN LA HIDRÓLISIS MEDIANTE ^{31}P -NMR.

En este capítulo se describe la caracterización de los fosfoglicéridos (PLs, LPLs y GPLs) en la lecitina cruda de girasol y las muestras modificadas.

Como ya se explicó en los capítulos 1 y 2, las lecitinas y lisolecitinas presentan propiedades emulsionantes en un amplio rango de aplicaciones, tanto en la industria alimentaria como cosmética y farmacéutica, pudiéndose comportar como emulsionantes o/w (aceite en agua) o w/o (agua en aceite). El tipo de aplicación depende de la composición de la lecitina, pudiendo variar en el tipo de PLs, o LPLs, contenido de lípidos neutros u otros compuestos como glicolípidos, ácidos grasos libres, etc., por lo que conocer la composición cuali y cuantitativa de los productos obtenidos en esta tesis es de gran importancia para determinar el tipo de sistema en el que pueden ser aplicados como emulsionante.

6.1. MATERIALES Y EQUIPOS

Las características de la lecitina cruda de girasol y la enzima utilizada para su hidrólisis fueron descritas en el capítulo 3 (sección 3.1.1 y 3.1.2, respectivamente).

Los materiales utilizados en la preparación de muestras para la determinación de fosfoglicéridos, así como los compuestos utilizados como estándares para su identificación y cuantificación, fueron descritos en el capítulo 5, sección 5.2.1.

Para el control de la reacción se utilizó un titulador automático (Dosimat 765, Metrohm, Herisau, Suiza) y un baño calefactor con recirculación de agua (Heating Circulating Baths, PolyScience[®], EEUU).

La determinación cuali-cuantitativa de fosfolípidos y sus formas hidrolizadas mediante espectrometría ^{31}P -NMR fue llevada a cabo en un equipo Bruker Avance 500 (500 MHz, Rheinstetten, Alemania), perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Gante, Bélgica. Las condiciones de operación del equipo fueron detalladas en el capítulo 5, sección 5.2.2.

Para las mediciones de pH se utilizó un analizador electroquímico Consort C6020 (Consort, Bélgica).

6.2. REACCIÓN DE HIDRÓLISIS

La hidrólisis enzimática de lecitina cruda de girasol se llevó a cabo según las condiciones óptimas recomendadas en el capítulo 4, utilizando la misma relación enzima: sustrato de 1 μL : 80 mg, pH=5, y una temperatura de reacción de 50 °C.

Considerando que las muestras de lecitina modificadas serían utilizadas luego como emulsionantes y que el uso de buffer en el medio de reacción para mantener el pH constante implicaría una posterior separación de las sales en las muestras obtenidas por hidrólisis, se recurrió a un procedimiento alternativo consistente en la regulación del pH siguiendo la titulación de los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis. Para ello, se utilizó un equipo titulador automático, el cual mide el pH y cuando detecta una variación de $\pm 0,05$ en su valor dosifica el volumen requerido de una solución ácida o básica hasta volver al valor de pH original. En este caso se utilizó una solución de NaOH 25 mM. El volumen de solución básica agregado así como el pH del medio de reacción son registrados por el equipo; lo cual no sólo es útil para el control de la reacción sino también para recalcular la concentración de lecitina en las muestras si es necesario, ya que puede haber una pequeña dilución según el volumen de solución agregado.

Se preparó una dispersión de lecitina agregando 4% m/m de lecitina cruda nativa de girasol en agua, utilizando agitación magnética a 50 °C, hasta obtener una mezcla homogénea. El pH inicial del medio de reacción se ajustó a un valor de 5,0 con unas gotas de HCl (0,1 N). El recipiente con la dispersión de lecitina en agua fue colocado en un baño de agua a fin de controlar y mantener su temperatura a 50 °C, y luego se agregó el volumen correspondiente de Lecitase® Ultra para lograr una concentración 0,05 % v/v.

La hidrólisis se llevó a cabo a diferentes tiempos (t_h) entre 5 y 360 min. Adicionalmente, se realizó un ensayo de 24 h de duración con el fin de determinar el estado estacionario de la reacción. Al término del periodo de reacción considerado, las mezclas fueron inmediatamente incubadas a 100 °C durante 10 min para inactivar la enzima y detener la reacción. La hidrólisis se realizó por duplicado para cada tiempo de reacción (t_h).

6.3. DETERMINACIÓN CUALI-CUANTITATIVA POR ^{31}P -NMR

La determinación de fosfoglicéridos en las muestras de lecitina cruda de girasol nativa y modificada por hidrólisis se llevó a cabo por el método propuesto de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de fósforo, en las condiciones resumidas en la Tabla 5.3 (capítulo 5, sección 5.3.2).

En la **Figura 6.1** se presentan algunos de los espectros obtenidos para la lecitina nativa ($t_{\text{h}}=0$) y modificada. Se muestran resultados a un tiempo de reacción corto (20 min), intermedios (60 y 360 min) y por último a 24 h.

Como ya se explicó en el capítulo anterior, la intensidad de la señal (área de pico) es directamente proporcional a la concentración molar de la especie en la muestra, y esta relación no varía según el tipo de compuesto.

Mediante las ecuaciones 5.1 y 5.2 (capítulo 5) se calculó la concentración de todas las especies observadas en los espectros, tanto de la lecitina nativa como de las muestras hidrolizadas, en mmol/ g lecitina, o su expresión equivalente: mmol/ 100 g lecitina. Luego, con el peso molecular medio de cada PL o LPL puede obtenerse el contenido de cada especie en mg/ g de lecitina, pudiendo calcular así el porcentaje en peso de cada especie presente en las lecitinas nativa y modificada. Para el cálculo del peso molecular medio de cada compuesto se utilizó un promedio ponderado de los pesos moleculares de los cuatro ácidos grasos mayoritarios presentes en la lecitina utilizada (ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico).

Las determinaciones se realizaron por duplicado, y se utilizó el test de Student (t -test) como método de comparación de medias. Para todos los compuestos, los valores promedio

calculados para distintos tiempos de reacción se compararon mediante este método y las diferencias se consideraron significativas para valores de $P < 0,05$.

6.3.1. COMPOSICIÓN DE FOSFOGLICÉRIDOS EN EL SUSTRATO

La **Figura 6.1 A** muestra las resonancias características de los principales fosfolípidos presentes en la lecitina cruda nativa de girasol utilizada como sustrato para la hidrólisis ($t_h = 0$). Puede observarse que el componente mayoritario es la fosfatidilcolina (PC), seguido del fosfatidilinositol (PI), y en menor proporción fosfatidiletanolamina (PE), ácido fosfático (PA) y fosfoglicerol (PG). Se observa también la presencia de lisofosfolípidos, como la lisofosfatidilcolina (LPC) o la lisofosfatidiletanolamina (LPE) en menor proporción.

En la **Tabla 6.1** se muestra la composición de PLs y LPLs en la lecitina cruda de girasol utilizada como sustrato de la reacción de hidrólisis, expresada en porcentaje en peso sobre el total de muestra (g/100 g lecitina), y sobre el total de fosfoglicéridos (FG) presentes en la muestra (g/100 g FG). Los valores presentados en todas las tablas son un promedio de dos determinaciones, y los coeficientes de variación de todos los datos obtenidos resultaron menores al 3%.

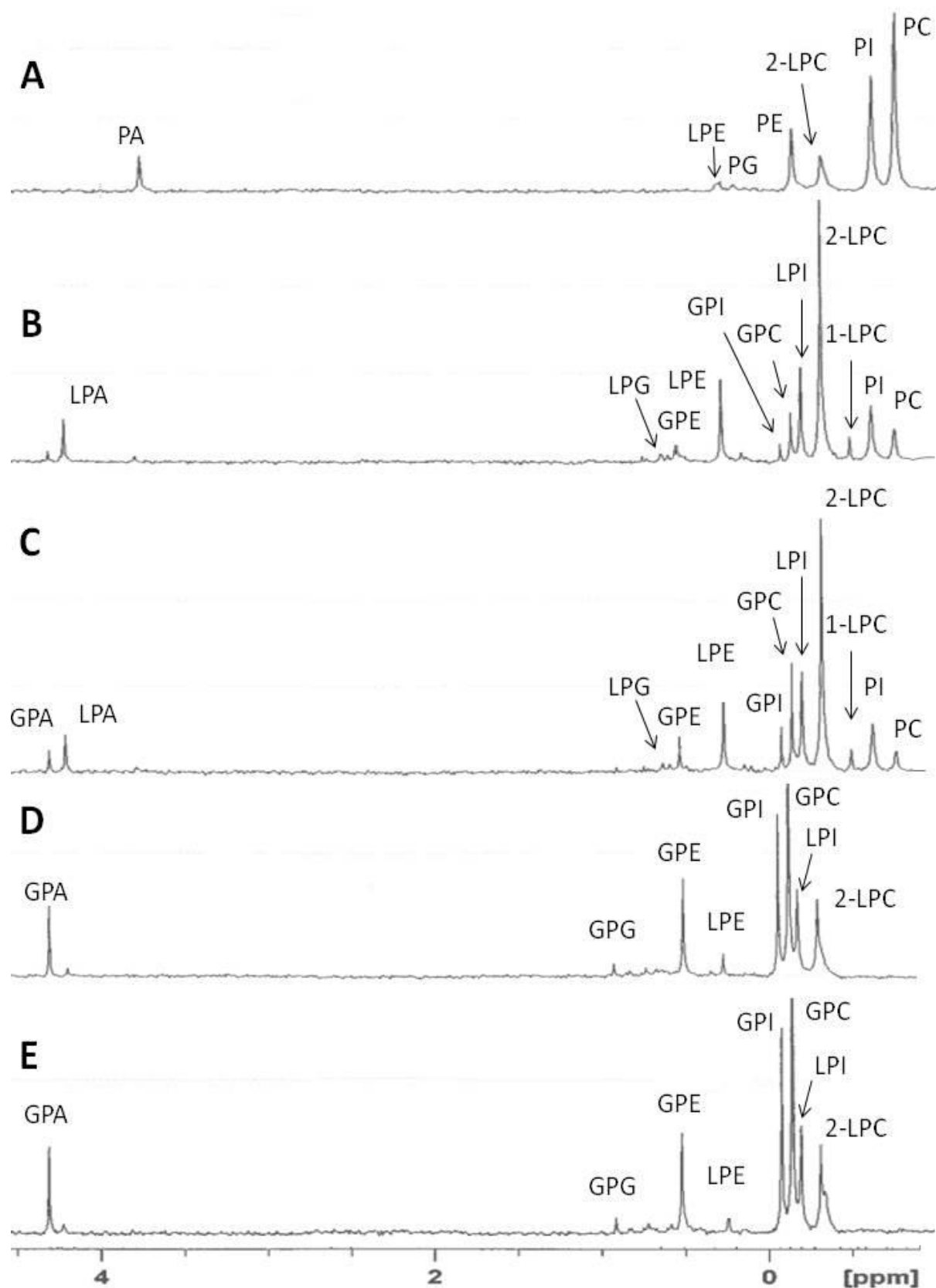


Figura 6.1. Espectros de resonancia magnética nuclear de fósforo (^{31}P -NMR) para lecitina cruda de girasol nativa (A) y modificada con tiempos de reacción de 20 min (B), 60 min (C), 360 min (D) y 24 h (E).

Tabla 6.1. Composición de fosfolípidos y lisofosfolípidos en la lecitina cruda de girasol utilizada como sustrato de hidrólisis, determinada por ^{31}P -NMR.

Composición de Fosfolípidos y Lisofosfolípidos en Lecitina Cruda Nativa de Girasol^a			
	Especie	g/ 100 g lecitina	g/ 100 g fosfoglicéridos
Fosfolípidos (PLs)	PC	17,88 ± 0,14	39,76 ± 0,67
	PI	12,53 ± 0,12	27,86 ± 0,53
	PE	7,15 ± 0,08	15,91 ± 0,33
	PG	0,84 ± 0,01	1,86 ± 0,05
	PA	2,17 ± 0,03	4,82 ± 0,11
	Total	40,57 ± 0,38	90,21 ± 1,69
Lisofosfolípidos (LPLs)	LPC	3,61 ± 0,03	8,04 ± 0,80
	LPE	0,79 ± 0,01	1,75 ± 0,40
	Total	4,40 ± 0,04	9,79 ± 1,20
Fosfoglicéridos (FG)	Total	44,97 ± 0,42	100 ± 2,89

^a Media aritmética ± Desviación estándar; n = 2; CV < 3%.

6.3.2. COMPOSICIÓN DE FOSFOGLICÉRIDOS EN LA LECITINA MODIFICADA POR HIDRÓLISIS

En los espectros correspondientes a la lecitina modificada mediante hidrólisis enzimática (**Figura 6.1 B-E**), se observa la aparición de señales correspondientes a otros lisofosfolípidos que no estaban presentes en la muestra original: lisofosfatidilinositol (LPI), lisofosfoglicerol (LPG) y el ácido lisofosfatídico (LPA); y los glicerofosfolípidos: glicerofosfatidilcolina (GPC)

glicerofosfatidilinositol (GPI), glicerofosfatidiletanolamina (GPE), glicerofosfoglicerol (GPG) y ácido glicerofosfatídico (GPA).

En la **Figura 6.1** se aprecia cómo a tiempos cortos de reacción (**Figura 6.1 B**, $t_h = 20$ min) se tiene una brusca disminución en el contenido de fosfolípidos que va de la mano de un aumento en el contenido de lisofosfolípidos. Se observa que el componente mayoritario de la muestra es ahora la 2-LPC. A medida que el tiempo de reacción avanza (**Figura 6.1 C-D**, $t_h = 60$ y 360 min) puede verse cómo las señales correspondientes a los PLs presentes en la lecitina nativa comienzan a desaparecer, y en cambio comienzan a apreciarse los picos correspondientes a la forma totalmente hidrolizada (glicerofosfolípidos), a la vez que se observa una disminución de los lisofosfolípidos.

Esto también puede observarse en la **Tabla 6.2**, donde se muestra la composición de fosfolípidos y sus formas hidrolizadas, en la lecitina nativa y las muestras modificadas, según el tiempo de reacción. En esta tabla, los valores se presentan en mmol/ 100 g de lecitina de manera que pueda realizarse el seguimiento de la reacción de hidrólisis más fácilmente.

Como resultado del análisis estadístico, se indican con letras distintas los valores que resultaron significativamente diferentes, para un mismo compuesto a los distintos t_h . Los valores máximos alcanzados por cada lisofosfolípido, se indican en sombreado, observándose que corresponden en general a $t_h = 20$ -30 min.

Cabe destacar que no se encontraron diferencias significativas entre las muestras con $t_h = 360$ min y 24 h, lo que sugiere que a las 6 h la reacción ya ha alcanzado el estado estacionario.

Esto queda reflejado en la **Figura 6.2** donde se muestra la evolución de las distintas especies a lo largo del tiempo de reacción.

Tabla 6.2. Composición de fosfoglicéridos en la lecitina cruda de girasol nativa e hidrolizada con distintos tiempos de reacción (t_h)

t _h (min)	Composición de Fosfoglicéridos Determinada por ³¹ P-NMR (mmol/ 100 g lecitina)*															
	PC	PI	PE	PG	PA	2-LPC	1-LPC	LPI	LPE	LPG	LPA	GPC	GPI	GPE	GPG	GPA
0	23,16 ^l	14,77 ^j	9,27 ^d	1,10 ^d	3,16 ^g	7,03 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	1,53 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
5	6,40 ^l	11,63 ^h	4,00 ^c	1,08 ^d	0,95 ^f	20,81 ^g	1,23 ^b	3,86 ^b	5,64 ^h	0,00 ^a	2,63 ^g	1,93 ^b	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
10	4,56 ^h	10,45 ^g	1,86 ^b	0,63 ^c	0,85 ^e	21,93 ^h	1,35 ^c	4,56 ^e	6,03 ⁱ	0,33 ^b	2,78 ^h	2,67 ^c	0,18 ^b	1,84 ^b	0,00 ^a	0,00 ^a
20	3,55 ^g	7,69 ^f	0,00 ^a	0,32 ^b	0,58 ^d	22,32 ^j	1,89 ^g	6,94 ^{h,i}	6,90 ^j	0,58 ^c	2,69 ^h	2,78 ^d	0,99 ^c	2,32 ^c	0,00 ^a	0,28 ^b
30	2,88 ^f	6,08 ^e	0,00 ^a	0,00 ^a	0,42 ^c	20,46 ^g	1,78 ^f	7,05 ^j	3,99 ^g	0,70 ^e	2,41 ^f	5,15 ^e	1,96 ^d	5,85 ^d	0,42 ^b	0,56 ^c
40	2,65 ^e	5,03 ^d	0,00 ^a	0,00 ^a	0,33 ^b	19,23 ^f	1,69 ^e	6,83 ^h	3,61 ^f	0,61 ^d	2,22 ^e	6,75 ^f	3,45 ^e	6,16 ^e	0,59 ^c	0,90 ^d
60	1,84 ^d	3,88 ^c	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	18,08 ^e	1,51 ^d	6,35 ^g	3,14 ^e	0,60 ^c	2,17 ^e	8,81 ^g	4,73 ^f	6,57 ^f	0,73 ^d	1,17 ^e
90	0,38 ^c	1,89 ^b	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	15,41 ^d	1,21 ^b	5,60 ^f	2,32 ^d	0,35 ^b	1,63 ^d	13,15 ^h	7,32 ^g	7,85 ^g	1,00 ^e	1,55 ^f
180	0,26 ^b	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	12,24 ^c	0,00 ^a	4,03 ^d	1,95 ^c	0,00 ^a	1,06 ^c	17,71 ⁱ	10,75 ^h	8,15 ^g	1,15 ^f	2,54 ^g
360	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	9,71 ^b	0,00 ^a	3,99 ^{c,d}	1,65 ^b	0,00 ^a	0,49 ^b	20,63 ^j	11,19 ⁱ	8,57 ^h	1,20 ^f	2,69 ^h
1440 (24 h)	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	8,74 ^b	0,00 ^a	3,94 ^c	1,79 ^b	0,00 ^a	0,42 ^b	21,04 ^j	11,18 ⁱ	8,41 ^h	1,21 ^f	2,74 ^h

* Media aritmética; n=2. Coeficientes de variación (CV%) <3.

Letras iguales en una misma columna indican que no existen diferencias significativas, con un 95% de confianza (P<0.05); “a” corresponde al menor valor y “j” al mayor.

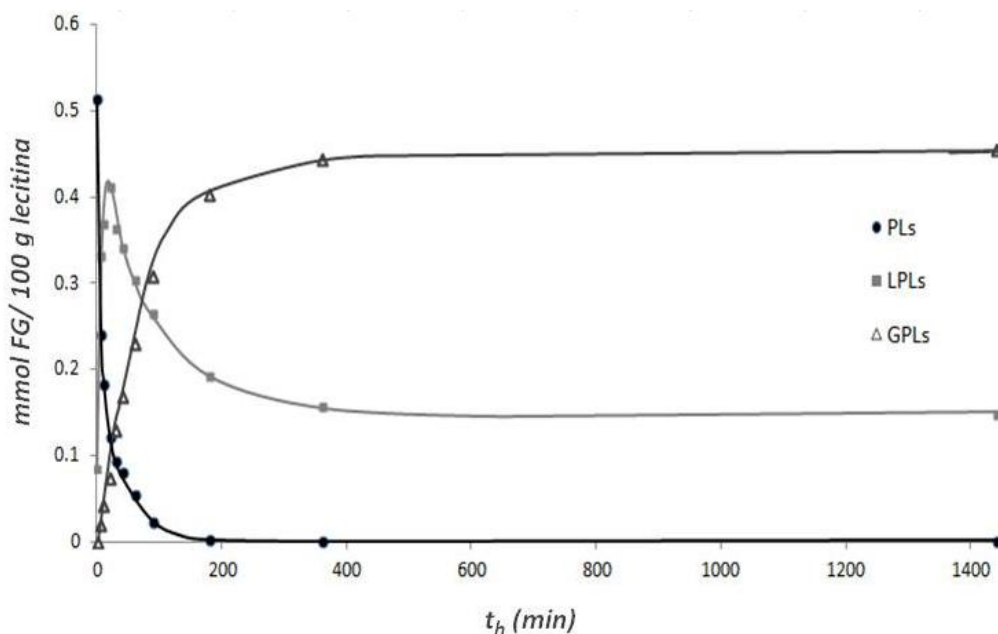


Figura 6.2. Evolución de las distintas especies de fosfoglicéridos (FG) con el tiempo de hidrólisis (t_h), mostrando el estado estacionario de la reacción desde 6 h (360 min) hasta 24 h (1440 min), permaneciendo constante la concentración tanto de fosfolípidos (PLs) como de lisofosfolípidos (LPLs) y glicerofosfolípidos (GPLs).

En la **Figura 6.3** se muestra una ampliación de la zona del espectro para valores de δ entre 0 y 0,5 ppm, para las muestras de lecitina modificada ($t_h = 20, 60, 360$ min y 24 h). En la misma puede apreciarse con mayor detalle la zona mencionada. Esto permite observar cómo con el tiempo de reacción disminuye el área relativa de los picos correspondientes a las especies de LPC y LPI, y a su vez aumentan los correspondientes a GPC y GPI.

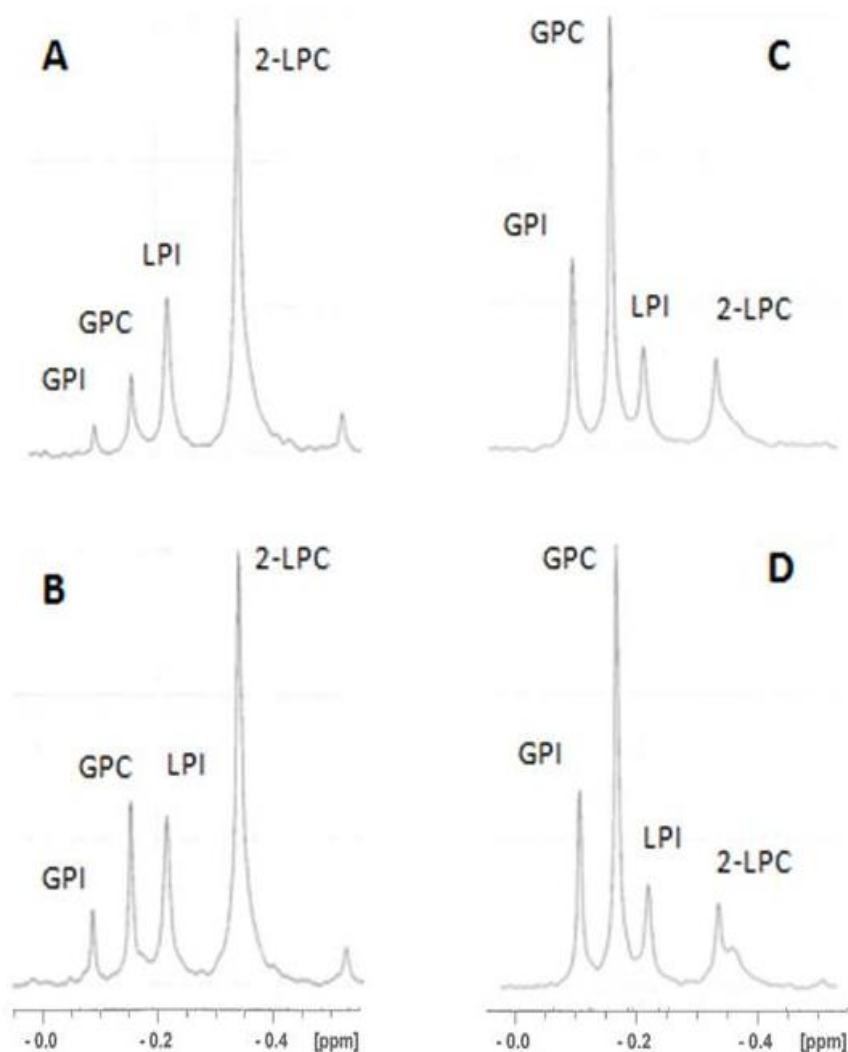


Figura 6.3 Detalle de espectros de resonancia magnética nuclear de fósforo para lecitinas modificadas con tiempos de reacción de 20 min (A), 60 min (B), 360 min (C), y 24 h (D). Se muestran los picos correspondientes al glicerofosfatidilinositol (GPI), glicerofosfatidilcolina (GPC), lisofosfatidilinositol (LPI), y 2-lisofosfatidilcolina (2-LPC).

En la **Figura 6.4** se muestra la disminución de las distintas especies de fosfolípidos durante la hidrólisis. Si se observan las curvas a tiempos cortos de reacción ($t_h < 5$ min), puede verse que la mayor pendiente inicial la presenta la fosfatidilcolina (PC), seguida de la fosfatidiletanolamina (PE) y el ácido fosfatídico (PA). Por su parte el fosfatidilinositol (PI) y el fosfoglicerol (PG) son las especies con menores velocidades iniciales de reacción. La baja

velocidad inicial del PG puede deberse a la pequeña concentración de esta especie en las muestras, pero para el caso del PI puede decirse que los resultados sugieren una baja selectividad de la enzima para este compuesto.

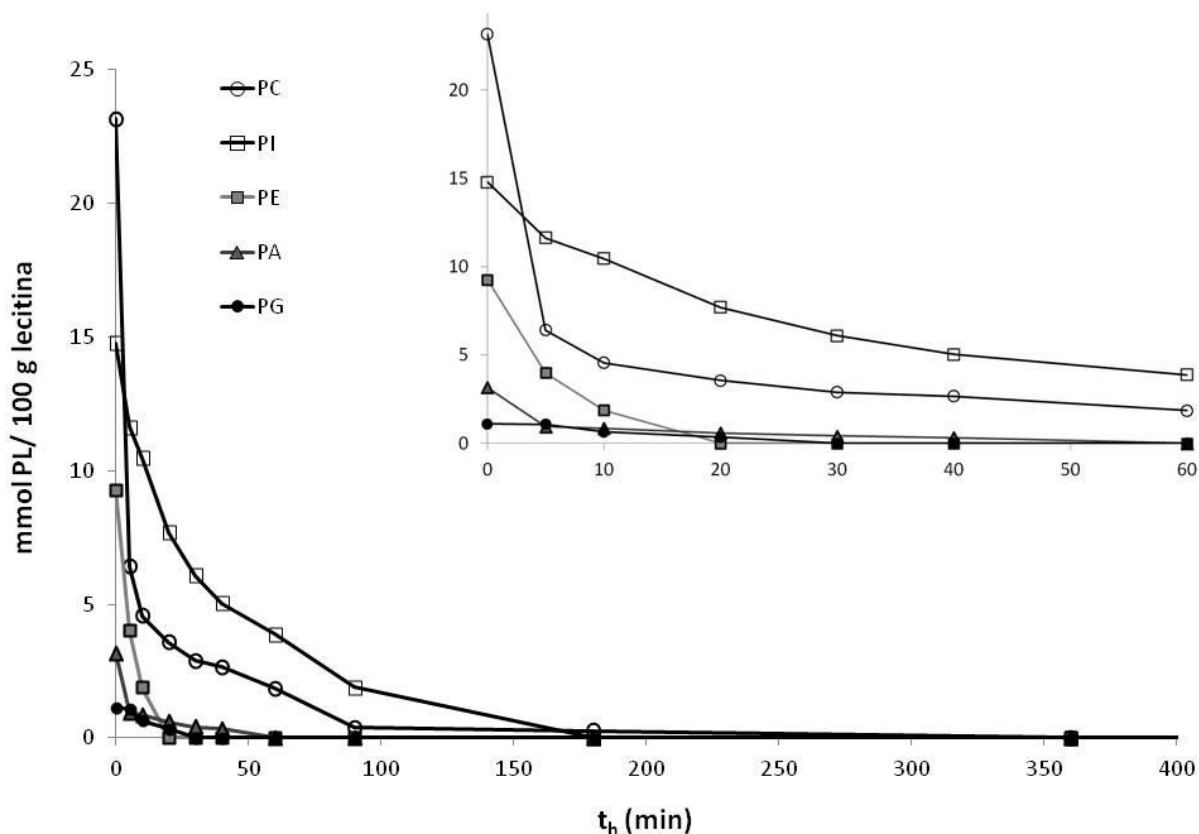


Figura 6.4. Disminución del contenido de fosfolípidos (PL) durante la hidrólisis de lecitina cruda de girasol.

Luego, en las condiciones de reacción estudiadas la enzima Lecitase® Ultra presentó una selectividad para la hidrólisis de PLs como se muestra a continuación:



Esto concuerda con datos reportados por otros autores para la hidrólisis de fosfolípidos con Lecitase® Ultra como catalizador (MacKenzie y col., 2009; Penci, 2009).

En la **Figura 6.5** se muestra la evolución de las distintas especies de lisofosfolípidos, durante la reacción de hidrólisis. Puede verse que para los componentes mayoritarios (LPC, LPI y LPE), la concentración aumenta hasta alcanzar su máximo a los 20 min de reacción, para luego comenzar a disminuir hasta llegar a un valor constante después de 6 h de hidrólisis (360 min).

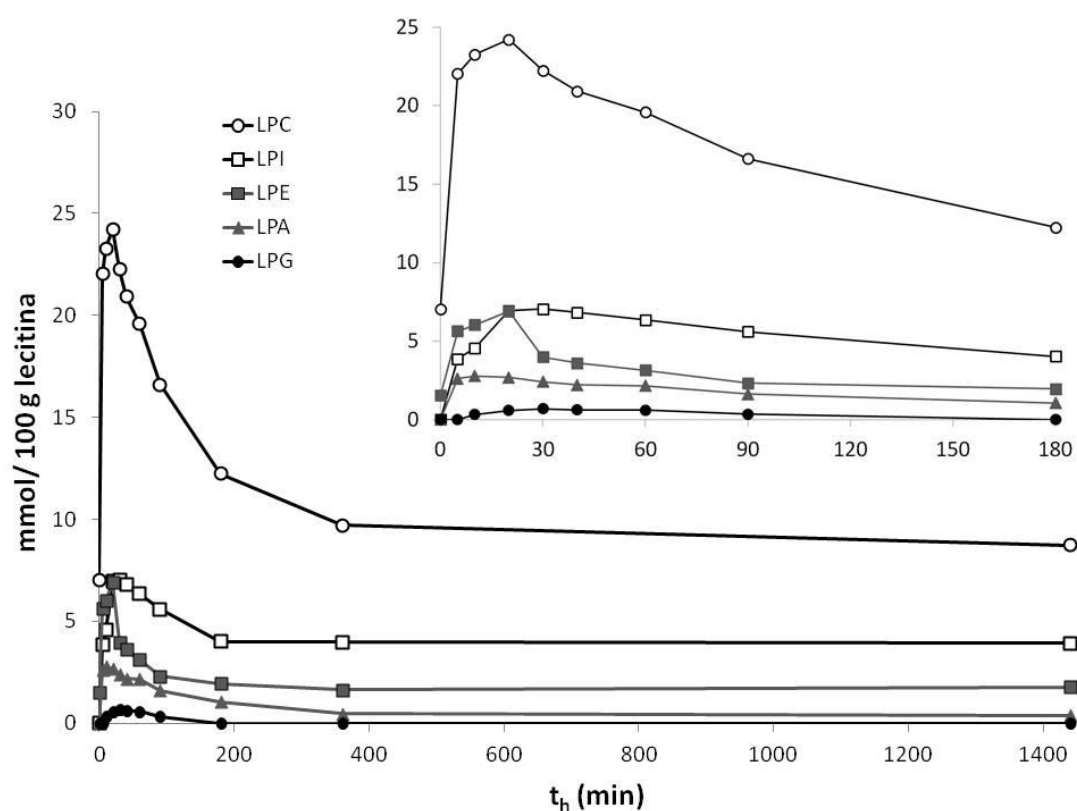


Figura 6.5. Evolución del contenido de lisofosfolípidos (LPL) durante la hidrólisis de lecitina cruda de girasol.

6.4. COMPARACIÓN CON MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Con el objeto de comparar los resultados obtenidos por NMR con otra técnica de determinación de fosfolípidos, se trabajó en colaboración con un grupo de investigación de la Universidad de Gante, Bélgica (Laboratorio de Ingeniería y Tecnología de Alimentos, Departamento de Seguridad y Calidad Alimentaria, Facultad de Bioingeniería). En dicho grupo han desarrollado una técnica de determinación de fosfolípidos por cromatografía líquida de alta performance (HPLC), utilizando un detector ELSD (Evaporative light scattering detector), que recientemente ha sido publicada (Nguyen y col., 2014).

El análisis de fosfolípidos y lisofosfolípidos se llevó a cabo en fase normal, en un equipo de HPLC Shimadzu (Tokyo, Japón), conectado a un detector ELSD (ELSD 3000, Alltech Associates Inc., Lokeren, Bélgica). La integración y adquisición de datos se llevó a cabo con un software LCSolution (Shimadzu, Japón). Se utilizó una columna de sílica (250 x 4,6 mm x 5 μm . YMC-Pack Diol Silica column. YMC, Kyoto, Japón), conectada a una pre-columna (7,5 x 93 mm x 5 μm , diol silica). El horno se mantuvo a 35 °C durante toda la medición. Como fase móvil se utilizó un gradiente ternario de *A*: hexano, *B*: metanol/ácido acético/trietilamina (97: 1,5: 1,8; v/v/v), y *C*: acetona/ácido acético/trietilamina (97: 1,5: 1,8; v/v/v). El gradiente de elución se muestra en la **Tabla 6.3**.

La temperatura del detector fue de 65 °C, y el flujo de gas nitrógeno para el nebulizador fue de 1,7 L/min. El volumen de inyección fue de 25 μL y las muestras fueron analizadas por duplicado. Para la identificación de los compuestos se utilizaron PLs y LPLs puros (PC, PI, PE, PA, PG, LPC, LPI, LPE, y LPA) de Sigma–Aldrich NV (Bornem, Bélgica). Para la determinación cuantitativa se utilizaron curvas de calibración previamente elaboradas, construidas con lecitina de girasol estándar (composición conocida de PLs y LPLs, determinada por ^{31}P -NMR, Spectral Service GmbH, Köln, Alemania).

Tabla 6.3. Programación de la fase móvil utilizada en la determinación de PLs y LPLs mediante HPLC-ELSD (Nguyen y col., 2014).

Programación de la Fase Móvil para HPLC-ELSD				
Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Solvente C (%)	Caudal (mL/min)
0	7	0	93	1,0
6	7	4	89	1,0
14,5	7	15	78	1,0
16	7	25	68	1,0
28	7	60	33	1,0
32	7	60	33	1,0
35	7	0	93	1,0
40	7	0	93	1,0

En la **Figura 6.6** se muestran los cromatogramas correspondientes a lecitina cruda de girasol nativa e hidrolizada durante 20 min. Cabe aclarar que debido a una disponibilidad limitada del equipamiento analítico, sólo se analizaron algunas muestras de lecitina representativas de distintas etapas de la reacción.

En los cromatogramas puede verse que mediante esta técnica no puede obtenerse información sobre el estado más hidrolizado de las especies que son los glicerofosfolípidos (GPL), lo que representa una desventaja del método con respecto al desarrollado por NMR. Además, las señales de LPA y LPE se superponen, obteniéndose un único pico para ambas especies, lo cual constituye una limitación en el poder de resolución de esta técnica.

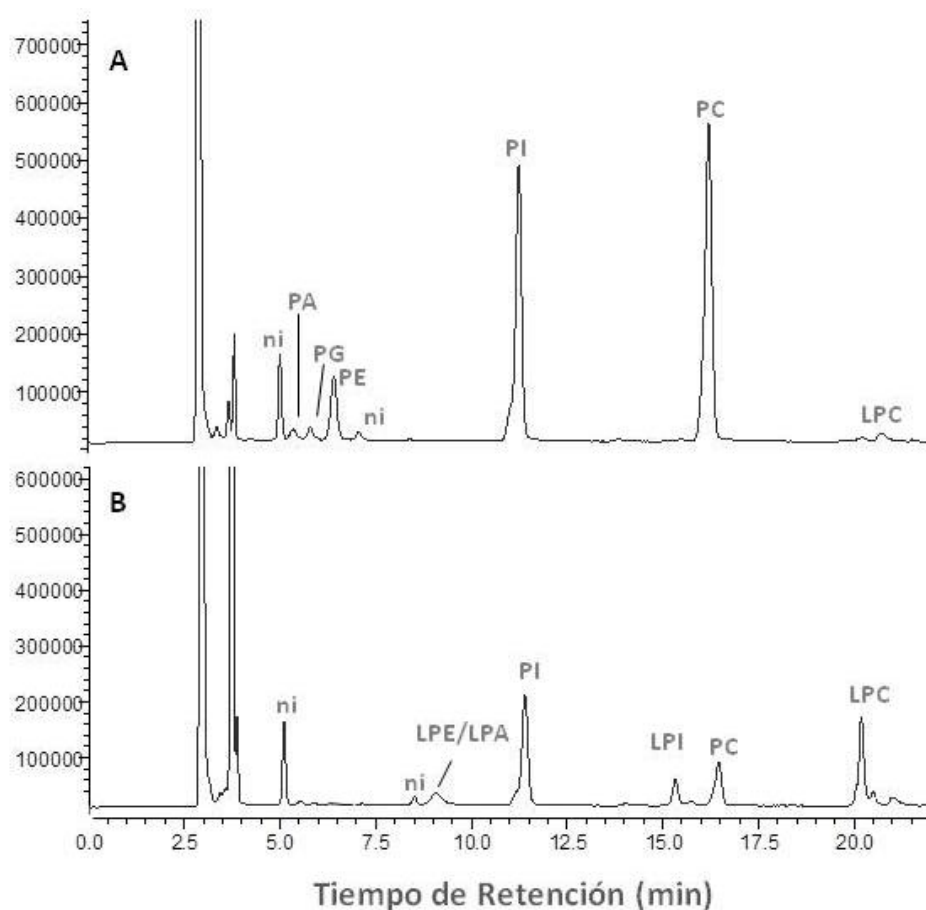


Figura 6.6. Ejemplos de cromatogramas obtenidos por HPLC-ELS de lecitina cruda de girasol nativa (A), e hidrolizada durante 20 min con Lecitase® Ultra (B), mostrando la detección de fosfolípidos (PA, PG, PE, PI, PC) y lisofosfolípidos (LPE, LPA, LPI, LPC), con algunos picos no identificados (ni).

Otra desventaja de esta metodología con respecto a la propuesta por NMR, es que la respuesta del detector varía según el compuesto, por lo que fue necesaria la utilización de curvas de calibración para la cuantificación de los analitos. Además, esta respuesta no es lineal con la concentración del analito, sino que sigue una relación potencial del tipo:

$$C = aA^b \quad (6.1)$$

Donde C es la concentración del compuesto en la muestra inyectada, en mg/mL; A es el área de pico correspondiente; y a y b son parámetros que varían según el compuesto, y se ajustan en base a las curvas de calibración.

En las **Tablas 6.4** y **6.5** se presenta una comparación de la cuantificación de fosfoglicéridos mediante el método sugerido de P-NMR y esta técnica de HPLC-ELSD.

Para todos los compuestos los valores determinados por HPLC-ELSD se compararon con los determinados por P-NMR mediante el test de Student (*t*-test), y las diferencias se consideraron significativas para valores de $P < 0,05$.

La **Tabla 6.4** muestra los resultados para la lecitina cruda nativa (sin hidrolizar), mientras que la **Tabla 6.5** muestra resultados semejantes para la lecitina hidrolizada durante 20 min. De este modo, puede compararse la cuantificación no sólo de los PLs sino también de los LPLs.

Puede observarse que con ambos métodos se obtienen valores promedio de composición semejantes, aunque los obtenidos por HPLC-ELSD presentan mayores coeficientes de variación (CV%). El análisis estadístico reveló que las diferencias observadas entre los valores determinados por ambos métodos para PC y PI no son significativas. En cambio para LPC, puede verse que a bajas concentraciones (para $t_h = 0$) el método de HPLC-ELSD arroja un valor menor que el de NMR, pero para concentraciones más altas de esta especie (para $t_h = 20$ min) las diferencias entre ambos métodos dejan de ser significativas.

Para el resto de los compuestos las diferencias resultaron significativas, pero pequeñas.

Tabla 6.4. Comparación de la determinación de PLs y LPLs mediante el método sugerido de P-NMR y HPLC-ELSD, para lecitina cruda nativa de girasol (Sin hidrolizar).

Determinación de Fosfoglicéridos en Lecitina Cruda Nativa de Girasol: Comparación de Métodos				
Compuesto	P-NMR		HPLC-ELSD	
	Valor*	CV%	Valor*	CV%
PC	23,16 ^a	0,76	22,81 ^a	4,12
PI	14,77 ^a	0,98	14,12 ^a	3,53
PE	9,27 ^b	1,15	8,89 ^a	1,91
PG	1,10 ^a	1,41	1,94 ^b	2,01
PA	3,16 ^b	1,59	2,96 ^a	1,98
LPC	7,03 ^b	0,73	6,53 ^a	2,34
LPI	0,00	-	0,00	-
LPE	1,53	1,23	0,00	-
LPA	0,00	-	0,00	-
LPG	0,00	-	0,00	-

* mmol PL/100 g lecitina. Media aritmética; n = 2

Letras iguales en una misma fila indican que no existen diferencias significativas, con un 95% de confianza ($P < 0,05$); "a" corresponde al menor valor y "b" al mayor.

Tabla 6.5. Comparación de la determinación de PLs y LPLs mediante el método sugerido de P-NMR y cromatografía líquida (HPLC-ELSD), para lecitina cruda de girasol hidrolizada con Lecitase® Ultra durante 20 min.

Determinación de Fosfoglicéridos en Lecitina Cruda Girasol Hidrolizada				
($t_h = 20$ min): Comparación de Métodos				
Compuesto	P-NMR		HPLC-ELSD	
	Valor*	CV%	Valor*	CV%
PC	3,55 ^a	1,32	3,31 ^a	4,92
PI	7,69 ^a	1,21	8,03 ^a	4,01
PE	0,00 ^a	-	0,00 ^a	-
PA	0,58 ^b	2,15	0,00 ^a	-
PG	0,32 ^b	2,68	0,00 ^a	-
LPC	24,22 ^a	1,03	25,16 ^a	4,81
LPI	6,94 ^b	0,71	5,86 ^a	3,61
LPE	6,90 ^b	0,74	5,38 ^{a,**}	4,21
LPA	2,69	1,23	-**	-
LPG	0,58	2,12	ni ^{***}	-

* mmol PL/100 g lecitina. Media aritmética; n = 2

** Se tiene una única señal correspondiente LPE + LPA

*** La técnica no permite la identificación del compuesto marcado con ni

Letras iguales en una misma fila indican que no existen diferencias significativas, con un 95% de confianza ($P < 0,05$); "a" corresponde al menor valor y "b" al mayor.

6.5. DISCUSIÓN

Los valores de fosfolípidos y lisofosfolípidos obtenidos por el método propuesto de ^{31}P -NMR para el sustrato concuerdan con los reportados en la literatura para lecitinas de girasol (van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008; Schneider, 2008; Cabezas, 2010).

De los resultados obtenidos para las muestras hidrolizadas, se desprende que en las condiciones estudiadas, además de la hidrólisis de fosfolípidos para generar lisofosfolípidos (monoalquil fosfoglicéridos) ocurre también la hidrólisis de éstos últimos, liberando el segundo ácido graso y generándose el correspondiente glicerofosfolípido (la forma más hidrolizada de los fosfoglicéridos).

Para todas las especies, se obtienen valores constantes luego de 6 horas de hidrólisis. Esto puede deberse a la inactivación de la enzima luego de ese período de tiempo, así como también a que la reacción haya llegado a su estado estacionario. No se observó hidrólisis completa de los LPLs; lo cual puede explicarse por el alto contenido de ácidos grasos libres en las muestras con tiempos de reacción mayores a 6 h, ya que pueden ocurrir procesos de re-esterificación, al encontrarse los productos en concentraciones tan altas con respecto a los sustratos. Cabe recordar que paralelamente a la reacción de hidrólisis de PLs ocurre la hidrólisis de lípidos neutros, lo que aumenta la concentración de AGLs en el medio de reacción, sobre todo a tiempos largos.

MacKenzie y col. (2009) han demostrado la especificidad de Lecitase® Ultra como PLA₁ en las condiciones de reacción ensayadas en esta tesis, descartando la posibilidad de que la enzima pueda hidrolizar el ácido graso en la posición *sn*-2. Sin embargo, como se ha visto, el análisis de las muestras hidrolizadas revela la presencia de GPLs. Esto puede explicarse mediante la reacción denominada *acil-migración*, en donde ocurre la migración del ácido graso en la posición *sn*-2 de los LPLs resultantes de la hidrólisis de PLs, a la posición *sn*-1, y de esta manera la enzima vuelve a hidrolizar el LPL obteniéndose el correspondiente GPL. Esta reacción se esquematiza en la **Figura 6.7**.

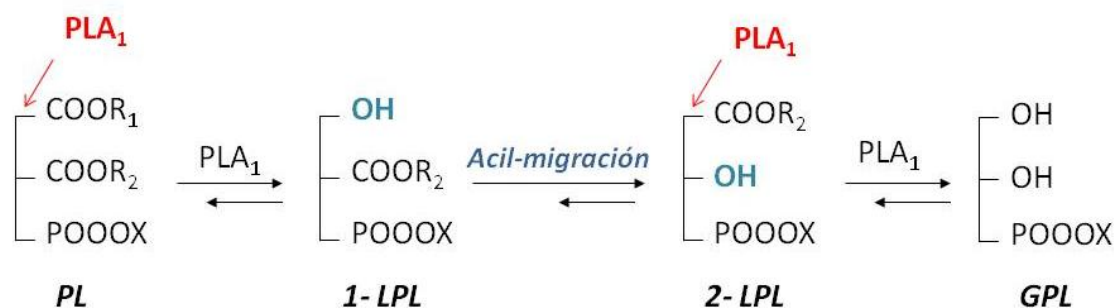


Figura 6.7. Reacción de hidrólisis de fosfolípidos utilizando Lecitase® Ultra (PLA₁) como catalizador enzimático.

La acil-migración es una reacción no enzimática, muy difícil de evitar debido a que la molécula del monoalquil-fosfolípido es termodinámicamente más estable cuando tiene el ácido graso en la posición *sn*-1, por lo que la conversión de 1-LPL a 2-LPL ocurre de manera espontánea. En general, esta migración es catalizada por ácidos o bases, y altas temperaturas, y se ve favorecida en medios con alto contenido de agua (Adlercreutz y col., 2001; Kiełbowicz y col., 2012)

Esta reacción no enzimática permite la hidrólisis de los lisofosfolípidos, por lo que genera que exista un punto óptimo de reacción donde se tiene el mayor contenido de LPLs, la especie de mayor interés para los objetivos de esta tesis. En las condiciones de reacción estudiadas, se encontró que este punto óptimo de mayor contenido de LPLs, se obtiene a un tiempo de hidrólisis de 20 min. Esto concuerda con lo encontrado por Zhang y col. (2012), cuyos estudios sobre la hidrólisis de fosfatidilcolina (PC) con Lecitase® Ultra, en condiciones similares a las estudiadas en esta tesis, dieron como resultado una disminución brusca de la PC durante los primeros 10 min de reacción, y un máximo de lisofosfatidilcolina (LPC) a los

20 min, con la obtención de glicerofosfatidilcolina (GPC) con una pureza cercana al 90% luego de 6 horas de reacción.

En la **Figura 6.8** se muestra un posible mecanismo propuesto para la migración del ácido graso de la posición *sn*-2 a la posición *sn*-1 (Pluckthun & Dennis, 1982).

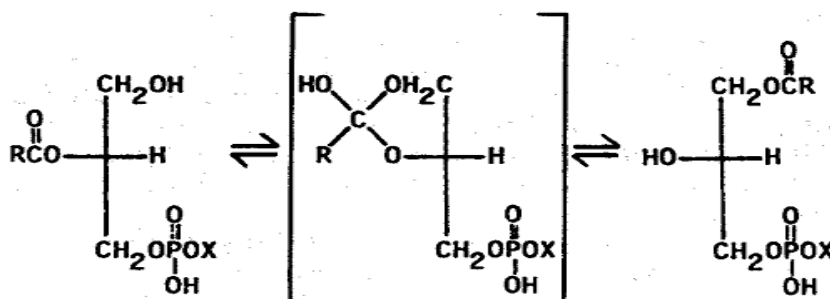


Figura 6.8. Posible mecanismo de acil-migración en medio ácido. Adaptado de Pluckthun & Dennis (1982).

Cabe destacar que la relación de 2-LPC/1-LPC al momento de la determinación por P-NMR puede no ser exactamente la misma que al momento de detener la hidrólisis por inactivación de la enzima. Por un lado, si bien la demora entre la toma de muestra y la determinación fue mínima, existe un tiempo de preparación de muestra y espera en el equipo en el que la reacción de acil-migración (no enzimática) puede seguir adelante, lo que llevaría a obtener mayores valores para esta relación de isómeros. Por otro lado, algunos estudios sugieren que a pH=5 (pH de la reacción) la migración de AGs de la posición *sn*-2 a la *sn*-1 es muy rápida obteniéndose una alta relación 2-LPC/1-LPC, mientras que a pH=8 (pH en que se realiza la medición) esta migración es más lenta. Además, a pH=8 la concentración de equilibrio de 2-LPC es menor que a pH=5, por lo que si se parte de relaciones de 2-LPC/1-LPC muy altas se podría observar la reacción en sentido opuesto (migración del AG en la posición

sn-1 a la *sn*-2), disminuyendo así la relación entre el isómero 2-LPC y el 1-LPC (Pluckthun & Dennis, 1982; Kunze y col., 1997; Kiełbowicz y col., 2012). De todos modos, las propiedades emulsionantes de ambos isómeros son similares, por lo que a los fines de su aplicación sólo importa el contenido total de ambos isómeros de LPC en la muestra.

Con respecto a las muestras de hidrólisis a tiempos largos de reacción ($t_h \geq 3$ h), los componentes mayoritarios en conjunto son las especies más hidrolizadas de los fosfoglicéridos, los glicerofosfolípidos (GPL), que no presentan propiedades surfactantes. Por ello estas muestras con alto grado de hidrólisis no son de interés en esta tesis. Sin embargo, la obtención de estos compuestos puede ser de interés para otras aplicaciones en la industria alimentaria o farmacéutica. Por ejemplo, la glicerofosfatidilcolina (GPC) es un potencial nutriente para su uso como aditivo alimentario y aplicaciones médicas, y en la naturaleza está presente sólo en cantidades pequeñas (trazas). Zhang y col. (2012) sugieren que en este momento un método de obtención de GPC con alta conversión y rendimiento, bajo costo y a su vez amigable con el ambiente, representa un gran desafío. Por ello la obtención de GPC utilizando una tecnología limpia como la enzimática, y a partir de un subproducto del proceso de desgomado de aceite de girasol, podría ser una alternativa muy atractiva.

De todo lo discutido, se desprende que las muestras de lecitina modificada de interés por sus propiedades emulsionantes potencialmente mejoradas con respecto a la lecitina nativa se obtienen durante la primera hora de reacción, debido a que luego el contenido de PLs y LPLs disminuye de manera considerable. Por lo tanto se eligieron estas muestras para el estudio del efecto de la modificación por hidrólisis en las propiedades surfactantes de la lecitina cruda de girasol, evaluando y comparando las propiedades de la lecitina cruda y modificada a distintos tiempos de reacción. Este estudio se presenta en el capítulo siguiente.

La caracterización de estas muestras obtenidas a tiempos cortos de reacción (10-60 min) se muestra en la **Tabla 6.6**.

Tabla 6.6. Composición de fosfolípidos y lisofosfolípidos en la lecitina cruda de girasol modificada por hidrólisis enzimática, determinada por ^{31}P -NMR.

		% m/m (g/ 100 g lecitina)				
		Tiempo de Hidrólisis				
		(t_h, min)				
Especie		10	20	30	40	60
Fosfolípidos (PLs)	PC	3,52	2,75	2,22	2,05	1,42
	PI	8,87	6,52	5,16	4,27	3,29
	PE	1,44	0,00	0,00	0,00	0,00
	PG	0,48	0,25	0,00	0,00	0,00
	PA	0,58	0,40	0,29	0,22	0,00
	Total	14,89	9,92	7,67	6,54	4,71
Lisofosfolípidos (LPLs)	LPC	11,97	12,46	11,44	10,76	10,07
	LPI	2,70	4,10	4,16	4,03	3,75
	LPE	3,10	3,55	2,06	1,86	1,62
	LPG	0,16	0,29	0,35	0,31	0,30
	LPA	1,19	1,15	1,03	0,95	0,93
	Total	19,13	21,56	19,05	17,91	16,67
%H_{PL}		64,32	76,37	81,77	84,44	88,88

^a Media aritmética; n = 2; CV < 3%.

Se presenta sólo el contenido de los especies de interés (PLs y LPLs), en porcentaje en peso, de manera que pueda compararse más fácilmente con valores hallados en la literatura, los que en general se presentan en dicha unidad. Asimismo en la tabla se muestra el correspondiente grado de hidrólisis de los PLs ($\%H_{\text{PL}}$) para cada tiempo de reacción, calculado según la Ec. 4.1 (capítulo 4)

6.6. CONCLUSIONES

La metodología P-NMR desarrollada demostró ser adecuada para la determinación de fosfolípidos y sus productos de hidrólisis en la lecitina cruda de girasol utilizada como sustrato en esta tesis. Con respecto a las muestras analizadas por HPLC-ELSD, el método desarrollado por P-NMR presentó la ventaja de permitir la identificación de todos los lisofosfolípidos presentes en la muestra, y también de los glicerofosfolípidos, permitiendo el seguimiento tanto de la formación como de la hidrólisis de los lisofosfolípidos, que son el principal compuesto de interés en las lecitinas modificadas. Esto permite evaluar en qué momento detener la reacción, según las características deseadas en el producto final.

Dependiendo de la aplicación deseada puede elegirse el tiempo de reacción que permita obtener la composición más adecuada, en términos de contenido total de fosfoglicéridos (PLs+LPLs), relación LPLs/PLs, relación de fosfoglicéridos hidrofílicos/hidrofóbicos, etc. Cabe mencionar que si bien existen algunos ejemplos concretos que permiten sacar conclusiones sobre el tipo de fosfoglicérido más adecuado para una aplicación dada, se trata todavía de un terreno empírico, que requiere de investigaciones más sistemáticas. Debido a ello, es posible también encontrar información contradictoria en la literatura. Por ello la caracterización del contenido de PLs y LPLs en lecitina cruda de girasol presentada en este capítulo podría permitir correlacionar su composición con sus características como agente emulsionante en diferentes aplicaciones.

6.7. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados del análisis de la composición de fosfoglicéridos fueron parcialmente publicados en los siguientes trabajos:

6.7.1. PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS

“Effect of hydrolyzed sunflower lecithin on the heat-induced coagulation of recombined concentrated milk emulsions”. Kasinos, M; **Goñi, M. L**; Nguyen, M. T; Sabatino, P; Martins, J. C; Dewettinck, K; Van der Meeren, P.

Artículo original; International Dairy Journal; 2014. Vol 38; pp 187-194.

6.7.2. PRESENTACIONES EN CONGRESOS

“Modificación de lecitina cruda de girasol mediante hidrólisis enzimática. Caracterización de los productos”. **Goñi ML**, Constenla DT, Van der Meeren P, Carelli AA.

Trabajo presentado como Póster y Trabajo completo en el V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2014). Noviembre 2014, Córdoba, Argentina.

“Effect of hydrolyzed sunflower lecithin on the heat-induced coagulation of recombined evaporated milk emulsions”. Kasinos, M; **Goñi, ML**; Sabatino, P; Van der Meeren, P.

Póster presentado en 8th NIZO Dairy Conference, “Functional Enzymes for Dairy Applications”. Septiembre de 2013, Papendal, Países Bajos.

6.8. BIBLIOGRAFÍA

- Adlercreutz, P., Virto, C., Persson, M., Vaz, S., Adlercreutz, D., Svensson, I., & Wehtje, E. (2001).** Enzymatic conversions of polar lipids. Principles, problems and solutions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *11*, 173–178.
- Cabezas, D. M. (2010).** *Modificaciones Tecnológicas de Lecitinas de Girasol. Aplicaciones en el Área Alimentaria*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Kiełbowicz, G., Smuga, D., Gładkowski, W., Chojnacka, A., & Wawrzenczyk, C. (2012).** An LC method for the analysis of phosphatidylcholine hydrolysis products and its application to the monitoring of the acyl migration process. *Talanta*, *94*, 22–29.
- Kunze, H., Bohn, E., & Eibl, H. (1997).** On the mechanism of lysophospholipase activity of secretory phospholipase A₂ (EC 3.1.1.4): deacylation of monoacylphosphoglycerides by intrinsic sn-1 specificity and pH-dependent acyl migration in combination with sn-2 specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1346*, 86–92.
- MacKenzie, A., Scott, D., Imamura, S., & Yazawa, K. (2009).** Determination of Phospholipase positional and substrate selectivities using ³¹P-NMR. *Industrial Research*, *91*, 22.
- Nguyen, M. T., Van de Walle, D., Petit, C., Beheydt, B., Depypere, F., & Dewettinck, K. (2014).** Mapping the Chemical Variability of Vegetable Lecithins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *91*(7), 1093–1101.
- Penci, M. C. (2009).** *Modificación Enzimática de Lecitinas*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur, Argentina.
- Pluckthun, A., & Dennis, E. A. (1982).** Acyl and phosphoril migration in Lysophospholipids: Importance in Phospholipid Synthesis and Phospholipase Specificity. *Biochemistry*, *21*, 1743–1750.
- Schneider, M. (2008).** Capítulo 2: Major sources, composition and processing. En *Phospholipid Technology and Applications* (pp. 21 – 39). Woodhead Publishing, Cambridge.

Van Nieuwenhuyzen, W., & Tomás, M. C. (2008). Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(5), 472–486.

Zhang, K., Liu, Y., & Wang, X. (2012). Enzymatic preparation of L- α -glycerylphosphorylcholine in an aqueous medium. *Journal of Lipid Science and Technology*, 1254–1260.

CAPÍTULO VII:

EVALUACIÓN DE LAS

PROPIEDADES

DE LAS LECITINAS

MODIFICADAS

7. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LAS LECITINAS MODIFICADAS

En los capítulos previos se describió el estudio de la modificación enzimática de lecitina cruda de girasol, detallando la caracterización de los productos obtenidos con distintos grados de hidrólisis.

En este capítulo se discutirá el estudio de una aplicación específica de la lecitina, para evaluar su desempeño en la estabilidad térmica de emulsiones lácteas sometidas a tratamiento térmico intenso y determinar si la modificación enzimática produce una mejora en dicha propiedad.

7.1. INTRODUCCIÓN

Las propiedades de las lecitinas como agentes emulsionantes, como así también las propiedades de las lecitinas modificadas por distintos métodos, han sido ampliamente

estudiadas en sistemas modelo constituidos por mezclas de agua y aceite (Penci, 2009; Cabezas, 2010; Guiotto, 2014).

El comportamiento físico-químico de una emulsión puede ser comprendido en detalle al estudiar mezclas de aceite puro, agua y un emulsionante, pero cuando se trata de emulsiones alimenticias reales, éstas son sistemas mucho más complejos. Además, el contenido de sales y/o el pH presentan una variación lo suficientemente grande como para tener efectos importantes en la estabilidad de las emulsiones alimenticias (Hasenhuettl, 2008).

Durante décadas se han utilizado lecitinas hidrolizadas en numerosos estudios para investigar su efecto en la estabilización térmica de emulsiones que contienen proteínas (como emulsiones lácteas que contienen caseínas y proteínas del suero), debido a indicios de que este tipo de lecitinas modificadas (lisolecitinas) son más efectivas que las lecitinas nativas (Dickinson & Yamamoto, 1996; McCrae, 1999; Sünder y col., 2001; Van der Meeren y col., 2005; Tran Le y col., 2007). Sin embargo, no hay información disponible sobre la eficacia de la lecitina hidrolizada en función del grado de hidrólisis.

Desde el punto de vista físico-químico, la leche es considerada una emulsión natural de aceite en agua (o/w), en la que las gotas de grasa están dispersas en una fase continua acuosa. El Código Alimentario Argentino (CAA, 2010) define como "*Leche Reconstituida*" al producto fluido y homogéneo obtenido por incorporación de agua potable a leche en polvo entera, parcialmente descremada o descremada, mediante un procedimiento tecnológicamente adecuado, sometido a posterior tratamiento térmico. Su contenido graso puede o no ser estandarizado. Por otra parte, el CODEX ALIMENTARIUS (WHO & FAO, 2011) distingue entre la "*Leche Recombinada*" y la "*Leche Reconstituida*", definiendo la primera

como el producto resultante de combinar grasa láctea y sólidos no grasos de leche, con o sin el agregado de agua, para alcanzar la composición adecuada de la leche; y la leche reconstituida, como el producto resultante del agregado de agua a la forma concentrada o en polvo del producto, en cantidad necesaria para restablecer la concentración apropiada de sólidos en la leche. Además, define la “*Mezcla de Leche Evaporada y Grasa Vegetal*” como el producto preparado al recombinar los constituyentes de la leche con agua potable y la adición de aceite vegetal comestible. En todos los casos el producto obtenido es una emulsión (o/w).

Como se ha explicado anteriormente (capítulo 2), mientras que en la leche cruda la interfase de los glóbulos de grasa está cubierta por una membrana denominada membrana del glóbulo graso (MFGM, del inglés: milk fat globule membrane), en la leche homogeneizada y reconstituida la interfase está cubierta principalmente por las proteínas de la leche, es decir, micelas de caseína y proteínas del suero.

Para obtener un producto microbiológicamente estable, en el procesamiento de lácteos y sus derivados se aplica un tratamiento térmico intenso. Una gran cantidad de estudios han demostrado que cuando se aplica un calentamiento, la configuración dimérica de la β -lactoglobulina -la principal proteína globular de la fracción del suero- se disocia y se vuelve monomérica. Además, tienen lugar reacomodamientos estructurales que dejan más expuestos sus residuos hidrofóbicos y grupos tiol, previamente encerrados o inaccesibles en la estructura globular; por lo tanto, pueden participar de la formación de agregados a través de reacciones de intercambio tiol-disulfuro con κ -caseína y otras proteínas del suero desnaturalizadas (Verheul y col., 1998; Anema & Li, 2003; Pelegrine & Gasparetto, 2005).

Durante el calentamiento de la leche tienen lugar varias reacciones, incluyendo la desnaturalización de las proteínas del suero y la formación de complejos entre estas proteínas desnaturalizadas, micelas de caseína y gotas de grasa, dando lugar a un fenómeno conocido como “coagulación térmica” (Jeurnink & Dekruif, 1993; Corredig & Dalgleish, 1996; Verheul y col., 1998; Oldfield y col., 2000; Singh, 2004; Dissanayake & Vasiljevic, 2009; Kasinos y col., 2014).

Varios estudios han demostrado que la lecitina, por tratarse de un surfactante natural de bajo peso molecular compuesto por una mezcla de varios fosfolípidos, puede tener influencia en la estabilidad de este tipo de emulsiones frente a tratamientos térmicos (Hardy y col., 1985; Crujisen, 1996; Fang & Dalgleish, 1996; Tran Le y col., 2007; McSweeney y col., 2008). Sin embargo, estos efectos han sido considerados tanto positivos como negativos, dependiendo del tipo y cantidad de lecitina agregada. Según se ha reportado, los fosfolípidos pueden actuar como estabilizantes, creando interacciones repulsivas entre las gotas de la emulsión; pero también podrían producir efectos negativos, desestabilizando las emulsiones al reducir la capacidad de adsorción de las proteínas en la interfase aceite/agua, sobre todo a altas concentraciones de fosfolípidos (Bergenståhl & Alander, 1997; Yamamoto & Araki, 1997). En consecuencia, se requiere un análisis más profundo de la influencia de los fosfolípidos en la estabilidad de este tipo de emulsiones complejas.

Por otra parte, McCrae (1999), Van der Meeren y col. (2005), Cabezas y col. (2011), y Tran Le y col. (2011) han reportado que la lecitina hidrolizada presenta mejores efectos de estabilización térmica que la lecitina nativa, al ser agregada a emulsiones o/w, debido a la mayor hidrofiliidad otorgada a la primera por los lisofosfolípidos. Además, Tran Le y col. (2007) han demostrado que la lecitina de soja hidrolizada reduce significativamente las

interacciones inducidas térmicamente entre proteínas del suero y caseína, mientras que el efecto de la lecitina nativa es casi despreciable. Como ya se explicó (capítulo 2) estas interacciones entre proteínas producen la formación de flóculos, lo que conduce a la inestabilidad de la emulsión y produce la posterior coagulación térmica, por lo que deben evitarse.

De manera similar, el análisis del tamaño de partícula realizado por Cabezas y col. (2011) y Sünder y col. (2001), así como la evaluación de la estabilidad térmica llevada a cabo por McCrae (1999) evidenciaron que las lecitinas hidrolizadas son más efectivas. Por su parte, Jost y col. (1989) han mencionado que la incorporación de lecitina hidrolizada antes o durante la emulsificación reduce la fuerza de una emulsión tipo gel “heat-set” de proteínas del suero.

Teniendo en cuenta estas investigaciones previas, y la diversidad de resultados reportados en la literatura, en esta tesis se decidió evaluar el efecto del agregado de lecitina nativa y modificada por hidrólisis, en la estabilidad térmica de este tipo de emulsiones complejas.

Además, se decidió incorporar el estudio de la influencia del grado de hidrólisis en dicho comportamiento, motivado por la falta de información sobre el tema en la literatura.

Para ello se han seleccionado sistemas de emulsiones lácteas, cuya estabilidad depende principalmente del estado y comportamiento de las proteínas presentes.

Como emulsión modelo para evaluar los efectos de la lecitina nativa y modificada en la prevención de la coagulación térmica de las proteínas lácteas y su efecto en la estabilidad, se eligieron dos tipos de sistemas:

Sistema A: Una emulsión de leche concentrada reconstituida a partir de leche en polvo descremada y aceite vegetal.

Sistema B: Una suspensión de proteínas de suero lácteo en agua (WPI, Whey Protein Isolate), sin contenido graso.

Para evaluar la estabilidad térmica de los dos sistemas estudiados se seleccionaron los parámetros más ampliamente utilizados, según lo reportado en bibliografía. Como ya se explicó en el capítulo 2, en el caso específico de los sistemas analizados, las proteínas juegan un papel clave en la estabilidad de las emulsiones, su apariencia, y su textura, sobretodo luego del tratamiento térmico. Por ello, la estabilidad de las emulsiones está íntimamente ligada al tamaño de partícula, la reología, y el contenido y comportamiento de las proteínas. A continuación se listan los parámetros analizados para evaluar la influencia de las lecitinas nativa y modificada en la estabilidad térmica, según el sistema analizado:

Sistema A:

- Medición de la distribución de tamaño de partícula de las emulsiones
- Medición de viscosidad de las emulsiones

Sistema B:

- Contenido de proteína residual en las suspensiones
- Ensayos de reología oscilatorios

Los materiales utilizados en la formulación de los dos sistemas y la metodología experimental se describen a continuación, en la sección 7.2.

7.2. MATERIALES

7.2.1. LECITINA CRUDA DE GIRASOL

Para los estudios presentados en este capítulo se utilizaron lecitina cruda de girasol nativa e hidrolizada con distintos tiempos de reacción (t_h), entre 10 y 60 min.

Las características de la lecitina nativa fueron descritas en el capítulo 3 (sección 3.1.1).

La hidrólisis de la lecitina cruda fue llevada a cabo en las condiciones descritas en el capítulo 6, y las características de la enzima utilizada se detallaron en el capítulo 3 (sección 3.1.2).

7.2.2. LECHE EN POLVO DESCREMADA (SMP)

La leche en polvo descremada (Skim Milk Powder - SMP), fue suministrada por Friesland Campina (Deventer, Países Bajos). Según el proveedor, el contenido de esta leche es de 37,3% (m/m) proteínas, 0,5% (m/m) grasa y 0,15% (m/m) fosfolípidos.

7.2.3. PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO (WPI)

El aislado de proteínas de suero lácteo (WPI) fue suministrado por Davisco Foods International, Inc. (BiPro[®], Le Sueur, MN, Estados Unidos). Según información suministrada por el proveedor, este aislado contenía un 92,6% (m/m) de proteínas totales (determinado por análisis Kjeldahl), de las cuales el 85% (m/m) eran β -lactoglobulina (determinado por análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida – PAGE). Además, el WPI contenía 1,6%

(m/m) de cenizas (determinado por calcinación a 525 °C), 5,0% (m/m) de humedad (determinado por pérdida de peso a 102 °C) y 0,8% (m/m) de grasa. Estos últimos datos también fueron suministrados por el proveedor.

7.2.4. ACEITE DE GIRASOL

El aceite de girasol alto oleico utilizado en la preparación del sistema A fue de Hozol, Contined (Bennekom, Países Bajos). Según datos suministrados por el proveedor, presenta un máximo de 0,05% (m/m) de ácidos grasos libres expresado como ácido oleico. Su bajo punto de fusión permite que permanezca claro durante su almacenamiento a 4 °C.

7.2.5. BUFFER DE CA-ÍMIDAZOL

Se seleccionó este buffer para la preparación de las emulsiones modelo de proteína de suero lácteo de modo tal de obtener un pH y una actividad de calcio semejantes a los de la leche de vaca. El buffer de Ca-imidazol, conteniendo 20 mM imidazol, 5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 30 mM NaCl y 1,5 mM NaN_3 , fue preparado de acuerdo a Anema (1997). Se ajustó su pH a 6,55 con una solución 1 M de HCl. Todos los reactivos utilizados eran de grado analítico.

7.3. METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DEL SISTEMA A

7.3.1. PREPARACIÓN DE LAS EMULSIONES

Las emulsiones de leche concentrada reconstituida fueron preparadas utilizando 16,5% (m/m) de SMP, 6,5% (m/m) de aceite de girasol alto oleico y lecitina de girasol nativa y modificada con distintos grados de hidrólisis (ver **Tabla 7.2**), en concentraciones desde 0,0 a 0,3% (m/m). Como base para las emulsiones de leche reconstituida se utilizó una solución acuosa de 0,02% (m/v) de NaN_3 (Acros Organics, Geel, Bélgica) con el fin de prevenir una posible contaminación microbiana.

En primer lugar, se adicionó la cantidad de lecitina correspondiente a la solución acuosa de NaN_3 mencionada, y a continuación, la suspensión de lecitina en agua se sometió a agitación magnética durante toda la noche (12 h) hasta obtener una dispersión completamente homogénea. Luego se agregó la leche en polvo, se agitó manualmente y por último se agregó el aceite de girasol alto oleico, agitando nuevamente la emulsión de forma manual.

Previo a la homogeneización, las emulsiones fueron pre-homogeneizadas durante aproximadamente 1 min utilizando un equipo IKA Ultra-Turrax TV-45 (Janke&Kunkel, Staufen, Alemania). Finalmente se siguió con la etapa de homogeneización a 55 °C utilizando un equipo Microfluidiser 110S (Micro fluidics Corporation, Newton, MA, Estados Unidos). En esta etapa, las muestras fueron microfluidizadas durante 2 min, a una presión de aire comprimido de 4 bar correspondiente a una presión de líquido de 560 bar. Luego de la microfluidización, se dejaron enfriar las emulsiones hasta temperatura ambiente. Todas las emulsiones preparadas presentaron un pH de 6,6.

7.3.2. TRATAMIENTO TÉRMICO

Antes del tratamiento térmico, se transfirió un volumen de 10 mL de cada emulsión preparada con diferente concentración de lecitina agregada, a viales de 20 mL (75,5 x 22,5 mm, Grace, Deerfield, IL, Estados Unidos) con tapas de cierre hermético para evitar evaporación. Las muestras fueron colocadas en un baño de aceite de temperatura controlada (Freitel Turbo SF®, de 5 L de capacidad) y calentadas durante 0-35 min a 121 °C. Luego del tratamiento térmico, las muestras se enfriaron rápidamente con agua fría.

7.3.3. MEDICIONES DE VISCOSIDAD

Para medir la viscosidad de las muestras antes y después del tratamiento térmico, se utilizó un viscosímetro programable LV-DV-II+ (Brookfield, Stoughton, MA, Estados Unidos) a velocidades entre 0 y 200 rpm, correspondientes a velocidades de deformación de 186 y 76 s⁻¹ para las agujas (*spindle*) 21 y 34, respectivamente. Todas las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente, y por duplicado. El *spindle* 21 (con un adaptador de volumen de 8 mL) se utilizó para medir la viscosidad de las muestras que conservaron su estructura líquida, mientras que el *spindle* 34 (inmerso directamente en los viales) se utilizó para medir la viscosidad de las muestras que tenían estructura de tipo gel.

Los datos experimentales obtenidos se ajustaron utilizando una relación tipo ley de potencia:

$$\tau = \kappa \dot{\gamma}^n \quad (7.1)$$

Como la viscosidad aparente (μ) se obtiene como la relación entre el esfuerzo de corte τ (en Pa) y la velocidad de deformación $\dot{\gamma}$ (en s^{-1}), la ecuación de ley de la potencia puede reescribirse como:

$$\mu = \kappa \dot{\gamma}^{(n-1)} \quad (7.2)$$

en donde κ representa el índice de consistencia y n representa el índice de comportamiento de flujo.

7.3.4. DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

La distribución de tamaño de partícula de las muestras de leche reconstituida concentrada se determinó utilizando un Mastersizer S longbed (versión 2.15, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido) equipado con una lente 300RF y una unidad de dispersión de muestra húmeda MSX-17. Para el cálculo de los resultados y la determinación de la distribución de tamaño de partícula se seleccionó el modelo polidisperso en el software del equipo, con un índice de refracción de 1,33 para la fase continua y de 1,46 para la fase dispersa (correspondientes a los índices de refracción del agua y el aceite, respectivamente).

7.4. METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DEL SISTEMA B

7.4.1. CONTENIDO DE PROTEÍNA RESIDUAL

Para el análisis del contenido de proteína residual se utilizó lecitina nativa e hidrolizada con tiempos de reacción de 10-60 min (**Tabla 7.2**). Se mezcló 1 mL de solución 5,5 % (m/v) de WPI con 1 mL de lecitina de girasol nativa o hidrolizada al 2% (m/v) en buffer de Ca-imidazol. Las muestras fueron preparadas en tubos de ensayo, calentadas durante 1 y 2 min en un baño de agua a 80 °C y finalmente enfriadas a temperatura ambiente con agua. Todas las muestras calentadas fueron centrifugadas por 20 min a 2900 × *g* utilizando una microcentrífuga 15P (Sigma Laborzentrifugen, Osterodeam Harz, Alemania). Los ensayos fueron realizados por duplicado.

El contenido de proteína residual en el sobrenadante se determinó en base al método colorimétrico de Schacterle & Pollac (1973), utilizando un espectrofotómetro Ultrospec® 1000 UV (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) a una longitud de onda de 650 nm. Se calculó el porcentaje de proteína residual ($P_R\%$) en relación a la cantidad de proteína que permanece en el sobrenadante en la muestra control (sin calentar):

$$P_R\% = \frac{[Proteína]ensayo}{[Proteína]control} \times 100 \quad (7.3)$$

Donde $[Proteína]ensayo$ es la concentración de proteína determinada para cada ensayo, en mg/mL, y $[Proteína]control$ es la concentración de proteína en el sobrenadante para la muestra control, sin calentar y sin el agregado de lecitina.

7.4.2. ENSAYOS DE REOLOGÍA OSCILATORIOS

Para los ensayos de reología oscilatorios se utilizó lecitina nativa y como muestra de lecitina modificada se eligió la que presentaba el mayor contenido de LPLs ($t_h = 20$ min, ver **Tabla 7.2**) que como se verá luego fue la que mostró mejores resultados en los ensayos de contenido de proteína residual.

Se utilizó en todos los experimentos un reómetro AR2000 (TA Instruments, Zellik, Bélgica) equipado con un sistema de medición de cilindro cónico concéntrico de 28 mm. Se colocó suavemente en la copa un volumen de 20 mL de una mezcla equivolúmica de WPI (5,5% m/v) y solución de lecitina nativa o hidrolizada (2% m/v) en buffer de Ca-imidazol, cubriéndola con film de aluminio para prevenir la evaporación de agua durante el experimento. Se formaron geles calentando las muestras de 20 a 80 °C a una velocidad de 2 °C/min, manteniendo la temperatura a 80 °C por 15 min y enfriando nuevamente hasta 20 °C a una velocidad de 2 °C/min. Las mediciones fueron realizadas a una frecuencia de 1 Hz y a máxima deformación de 0,002.

7.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.5.1. EFECTO DE LA LECITINA DE GIRASOL SIN MODIFICAR EN LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE LAS EMULSIONES

Se investigó el impacto de la lecitina en la coagulación térmica de emulsiones de leche concentrada reconstituida sometidas a calentamiento a 121 °C 10-25 min, incorporando lecitina cruda nativa a concentraciones de 0,0; 0,1; 0,2; y 0,3 % (m/m).

Para todas las muestras, los datos obtenidos de viscosidad aparente se ajustaron muy bien a la expresión derivada de la ley de la potencia descrita en la metodología (Ec. 7.2). En la **Tabla 7.1** se muestran los valores obtenidos en el ajuste para los índices de consistencia (κ), y de comportamiento de flujo (n), junto con el valor de R^2 .

Puede verse que el comportamiento de flujo de la emulsión original (sin calentar), fue cercano al de un fluido newtoniano ($n = 0,827$), mientras que las muestras sometidas a tratamiento térmico mostraron un comportamiento pseudoplástico más marcado a medida que la intensidad del tratamiento aumentaba, como consecuencia de la coagulación térmica, llegando a un valor de $n = 0,6$ para la muestra sin agregado de lecitina con un tiempo de calentamiento (t_c) de 25 min.

Por su parte, el índice de consistencia de las emulsiones sometidas a calentamiento se caracteriza por un decrecimiento gradual a medida que se incrementa la cantidad incorporada de lecitina nativa.

Tabla 7.1. Índices de consistencia (κ , en $\text{mPa}\cdot\text{s}^n$) y comportamiento de flujo (n) calculado para muestras de leche evaporada reconstituida con el agregado de lecitina nativa, calentadas a 121 °C, durante tiempos de calentamiento (t_c) de 0-25 min.

t_c (min)		<u>Lecitina Cruda de Girasol (%)</u>			
		0,0	0,1	0,2	0,3
0	κ	11	-	-	-
	n	0,827	-	-	-
	R^2	0,9802	-	-	-
10	κ	28	24	22	21
	n	0,716	0,767	0,737	0,692
	R^2	0,9820	0,9858	0,9821	0,9890
15	κ	49	29	21	18
	n	0,714	0,762	0,810	0,790
	R^2	0,9801	0,9991	0,9817	0,9883
20	κ	164	41	37	19
	n	0,686	0,767	0,760	0,768
	R^2	0,9968	0,9876	0,988	0,9902
25	κ	1092	267	56	31
	n	0,600	0,628	0,769	0,762
	R^2	0,9940	0,9998	0,9898	0,9872

En la **Figura 7.1** se muestra la evolución del índice de consistencia para las emulsiones sin el agregado de lecitina (A) y con 0,3% de lecitina agregada (B).

Puede observarse que para tratamientos superiores a 15 min el índice de consistencia de la muestra sin el agregado de emulsionante sufre un marcado aumento, mientras que la muestra con 0,3% de lecitina permanece, incluso a tiempos largos, con valores similares a la muestra sin calentar ($t_c = 0$).

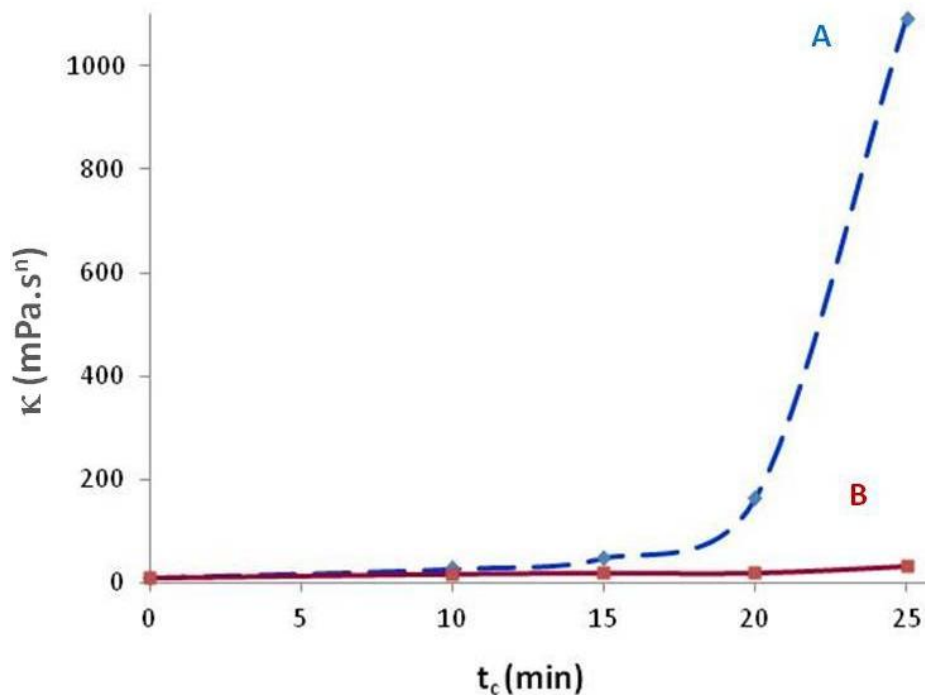


Figura 7.1. Índices de consistencia (K) calculados para la emulsión sin lecitina (A) y con el agregado de 0,3% de lecitina (B), en función del tiempo de calentamiento (t_c).

La **Figura 7.2** muestra el diámetro medio de partícula obtenido para las emulsiones con y sin agregado de lecitina, antes y después del tratamiento térmico ($D_{4,3}$ – ver capítulo 2, Ec. 2.7).

Los valores presentados son el promedio de cuatro determinaciones del $D_{4,3}$. Puede observarse que el tamaño de partícula promedio de las emulsiones con 0,3% de lecitina agregada no se incrementa significativamente con el calentamiento, manteniendo valores similares a los de la muestra sin calentar ($t_c = 0$ min). Esto fue verificado mediante un método de comparación de medias (test de Student).

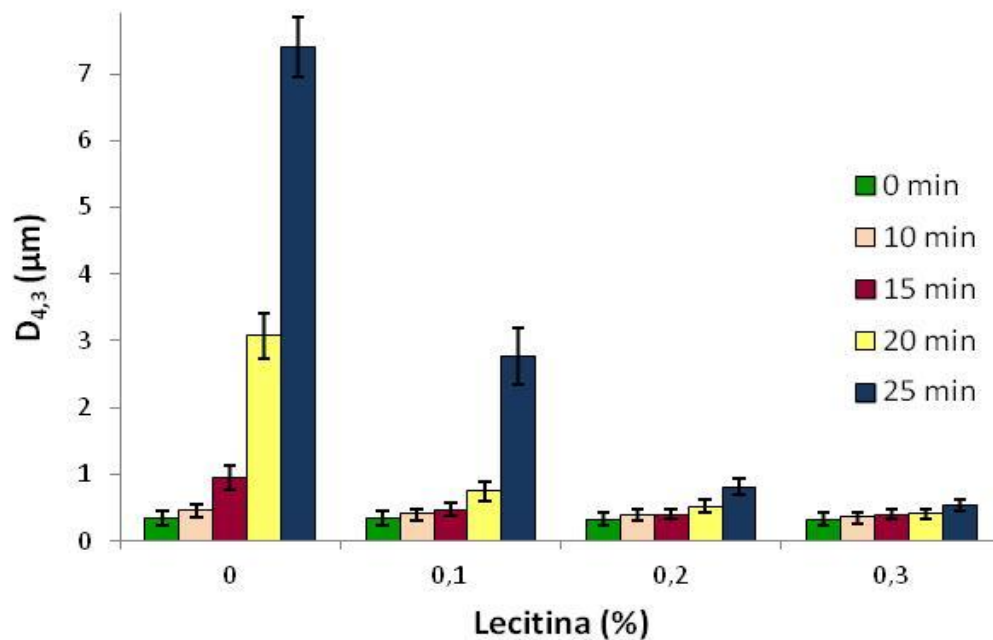


Figura 7.2. Diámetro promedio de partícula ($D_{4,3}$) de las emulsiones con lecitina nativa según la intensidad del tratamiento térmico. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar ($n = 4$).

Por el contrario, la muestra sin el agregado de lecitina (0%) muestra un incremento notable en el diámetro medio de partícula. Para estas muestras, en ausencia de fosfolípidos, se obtuvo un producto final con características de gel o de sólido luego del tratamiento a

121 °C por 25 min, lo cual es indicativo de coagulación térmica. En tales casos, se evidenció la formación de grumos en los viales.

En términos generales, la lecitina de girasol fue efectiva en reducir tanto el incremento de la viscosidad como del tamaño promedio de partícula inducido por el tratamiento térmico.

Mientras que la viscosidad de la muestra de referencia (0,0% de lecitina) fue afectada fuertemente al incrementar el tiempo de calentamiento, la adición de 0,3% de lecitina de girasol nativa permitió obtener muestras con índices de consistencia similares a las de la emulsión no calentada.

Los resultados demostraron que en las emulsiones sin agregado de lecitina, el tratamiento térmico produce un aumento tanto en el tamaño de partícula como en la viscosidad de la emulsión, observándose para tiempos prolongados (20 y 25 min) la aparición de grumos y la formación de un gel de consistencia semi-sólida.

Por su parte, las muestras con agregado de lecitina presentaron valores inferiores de viscosidad aparente y tamaño de partícula, observándose un mayor efecto al aumentar la concentración de lecitina agregada. El aspecto de estas muestras era más fluido y homogéneo. Las muestras con 0,3% de lecitina mantuvieron su textura fluida incluso luego de los tratamientos más prolongados.

Estos resultados concuerdan con las observaciones de Hardy y col. (1985), quienes reportaron que la adición de 0,2% (m/m) de lecitina tenía un efecto estabilizante en las emulsiones de leche concentrada homogeneizada, incrementando el tiempo de coagulación en aproximadamente 30 min, luego de calentar a 120 °C.

Las curvas de la distribución diferencial de tamaño de partícula que se muestran en la **Figura 7.3** confirman los resultados antes discutidos. El efecto de los fosfolípidos fue claramente demostrado por el hecho de que la formación de partículas mayores a 1 μm era muy limitada a medida que se incorporaba una cantidad mayor de lecitina. En esta figura, puede verse claramente que el inicio de la agregación tuvo lugar durante el calentamiento por 10 min, puesto que se observa un pequeño pico en el rango de 1-5 μm debido a la formación de agregados de gotas de la emulsión.

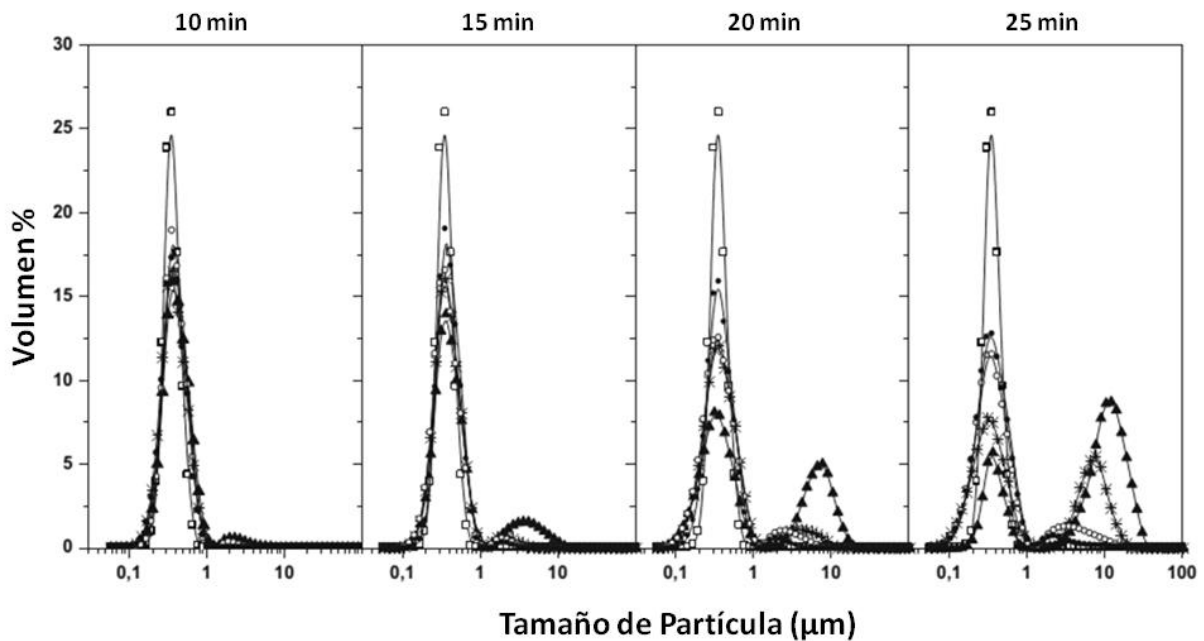


Figura 7.3. Distribución diferencial de tamaño de partícula para emulsiones con agregado de lecitina sin modificar (\blacktriangle) 0,0%, ($*$) 0,1%, (\circ) 0,2% y (\bullet) 0,3% (m/m), a distintos tiempos de calentamiento, comparadas con la muestra control, sin agregado de lecitina y sin calentar (\square).

El diámetro promedio ponderado por el volumen ($D_{4,3}$) se incrementó notablemente de 0,34 (para la muestra no calentada) a 0,47; 0,95; 2,29; y 7,39 μm para las muestras calentadas por 10, 15, 20 y 25 min en ausencia de lecitina, respectivamente. En cambio, al incorporar 0,3% de lecitina, estos valores se redujeron drásticamente a 0,36; 0,40; 0,48 y 0,52 μm , indicando que las emulsiones eran más resistentes a la coagulación inducida térmicamente.

Estas observaciones concuerdan con el incremento en la estabilidad térmica de una formulación modelo de alimento infantil en presencia de lecitina, observado por McSweeney y col. (2008). Estos autores hallaron que no se produce ningún cambio significativo en la muestra control (sin lecitina) luego de 10 min de calentamiento, mientras que el sistema coagulaba luego de los 18 min. Por otra parte, las emulsiones que contenían 5 g/L de lecitina eran más estables y sólo se producía la coagulación luego de los 25 min. Los autores atribuyen este incremento de la estabilidad térmica en presencia de lecitina a la formación de complejos proteína-fosfolípido. De manera similar, Crujisen (1996) observó que la adición de lecitina cruda de soja a emulsiones estabilizadas por caseína era beneficiosa desde el punto de vista de la estabilidad térmica cuando se agregaba antes de la homogeneización: el tiempo de coagulación térmica se incrementaba de 15 a 65 min (a 120 °C).

7.5.2. IMPACTO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LECITINA DE GIRASOL EN LA ESTABILIDAD TÉRMICA Y EFECTO DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

Para evaluar el efecto del grado de hidrólisis de los fosfolípidos en la lecitina modificada se utilizaron muestras con tiempos de reacción (t_h) entre 0-60 min. Las condiciones de reacción fueron las descritas en el capítulo 6. La composición en PLs y LPLs de las muestras utilizadas fue analizada mediante la técnica desarrollada de espectrometría de resonancia magnética

nuclear de fósforo (^{31}P NMR), descrita en el capítulo 5. Como ya se discutió en el capítulo 6, el contenido de fosfolípidos cambia drásticamente luego de la hidrólisis. En la **Tabla 7.2** se detalla la composición de las muestras utilizadas en este estudio. Se seleccionaron muestras sometidas a hidrólisis durante 10 a 60 min que, como se ha visto, corresponden a los mayores valores de lisofosfolípidos. Como se ha detallado en el capítulo 6, el análisis estadístico comprobó que las diferencias observadas en la composición de PLs y LPLs para estas muestras resultaron significativas. En la Tabla 6.6 (capítulo 6, sección 6.5) puede verse el detalle del tipo de PLs y LPLs presentes en estas muestras.

Tabla 7.2. Contenido de fosfolípidos y lisofosfolípidos en la lecitina cruda nativa ($t_h = 0$) y modificada mediante hidrólisis enzimática.

Composición de las distintas muestras de lecitina nativa y modificada según el grado de hidrólisis			
t_h (min)	%H _{PL}	Fosfolípidos*	Lisofosfolípidos*
0	-	40,57	4,40
10	64,32	14,89	19,13
20	76,37	9,92	21,56
30	81,77	7,67	19,05
40	84,44	6,54	17,91
60	88,88	4,71	16,67

* % (m/m). Suma de los valores promedio de cada especie, con $n = 2$, y con un coeficiente de variación < 3%

Un aspecto interesante para destacar es que el contenido de lisofosfolípidos no se incrementó de manera continua a lo largo de la reacción de hidrólisis, sino que alcanzó una concentración óptima (máxima) a los 20 min y luego comenzó a disminuir gradualmente. Como ya se explicó en el capítulo 6 esta disminución de LPLs puede deberse a la migración del ácido graso remanente en la posición *sn*-2 a la posición *sn*-1 y la posterior hidrólisis para dar el correspondiente glicerofosfolípido, sin propiedades emulsionantes.

7.5.2.1. SISTEMA A: EMULSIONES DE LECHE CONCENTRADA RECONSTITUIDA

Para el estudio de la influencia de la hidrólisis enzimática en la estabilidad térmica de las emulsiones de leche concentrada reconstituida, se eligió una concentración de 0,3% (m/m) tanto para la lecitina cruda nativa como modificada, en base a los resultados obtenidos para la lecitina sin modificar. A su vez, el tiempo de tratamiento térmico, en comparación con los experimentos previos, se aumentó de 25 a 35 min debido a que a con calentamientos de menor duración la lecitina de girasol nativa tenía un efecto estabilizante tan pronunciado que casi no podía observarse una mejora. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Los resultados de las mediciones de viscosidad aparente se muestran en la **Figura 7.4**, evidenciando que el grado de hidrólisis enzimática juega un papel importante en el efecto de la lecitina sobre el incremento de la viscosidad inducido térmicamente de emulsiones de leche concentrada reconstituida.

En muestras tratadas térmicamente, en ausencia de fosfolípidos, el coeficiente de consistencia fue de 1771 mPa.sⁿ, mientras que con la adición de 0,3% de lecitina nativa disminuyó a 1099 mPa.sⁿ. Los coeficientes de consistencia correspondientes en presencia de

0,3% de lecitina hidrolizada fueron 143, 37, 66, 190 y 606 mPa.sⁿ, para un tiempo de hidrólisis enzimática de 10, 20, 30, 40 y 60 min, respectivamente.

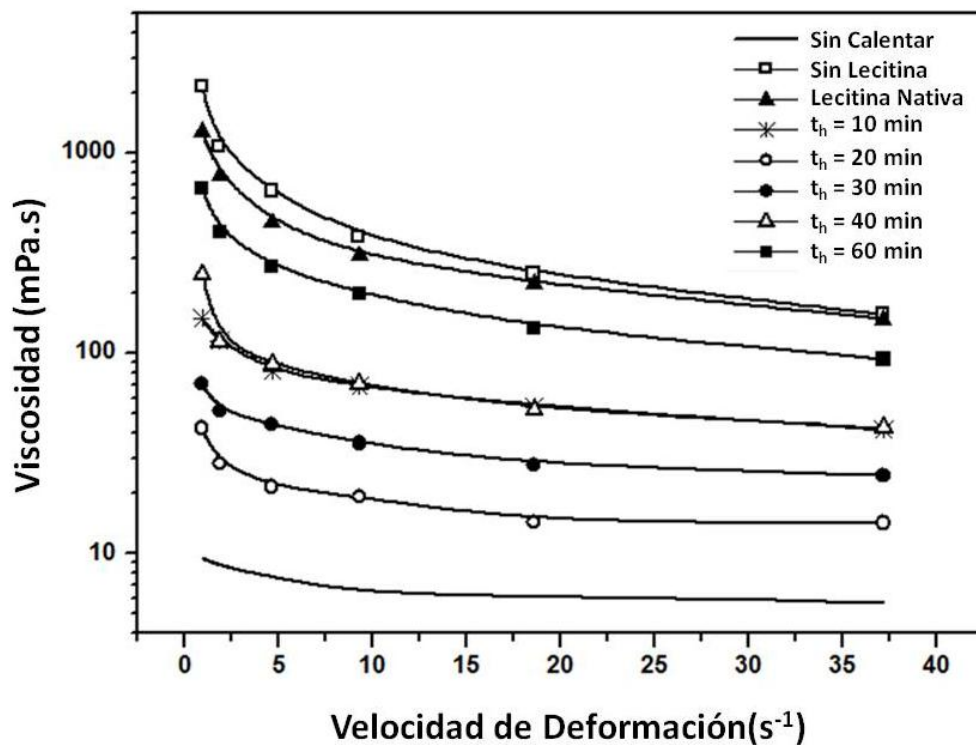


Figura 7.4. Viscosidad de las emulsiones luego del tratamiento térmico ($T=121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 35 min) en función de la velocidad de deformación, para muestras sin emulsionante, y con el agregado de lecitina cruda nativa, y modificada con distintos tiempos de hidrólisis (t_h); comparadas con la muestra control, sin agregado de lecitina y sin calentar.

La **Figura 7.5** muestra las curvas de distribución de tamaño de partícula en volumen. Es evidente que en el tratamiento térmico durante 35 min y en ausencia de lecitina, se produjo un significativo aumento del tamaño de partícula promedio, debido a agregación. Este fenómeno podría atribuirse a la desnaturalización de las proteínas del suero y la formación de complejos entre estas proteínas, micelas de caseína y gotas de grasa (Oldfield y col., 2000; Singh, 2004). La incorporación de lecitina nativa de girasol desplazó la distribución de

tamaño de partícula hacia valores algo menores, lo cual es un indicativo de una emulsión más resistente térmicamente que aquella sin agregado de lecitina aunque el efecto no es tan destacado como cuando se agregan las lecitinas hidrolizadas. La adición de 0,3% de lecitina hidrolizada durante 10, 30, 40 y 60 min tuvo un efecto estabilizante muy pronunciado en comparación con la emulsión sin lecitina. Sin embargo, el agregado de lecitina hidrolizada durante 20 min condujo a emulsiones con coagulación limitada, incluso luego del calentamiento en estas condiciones severas, siendo esta formulación la más efectiva.

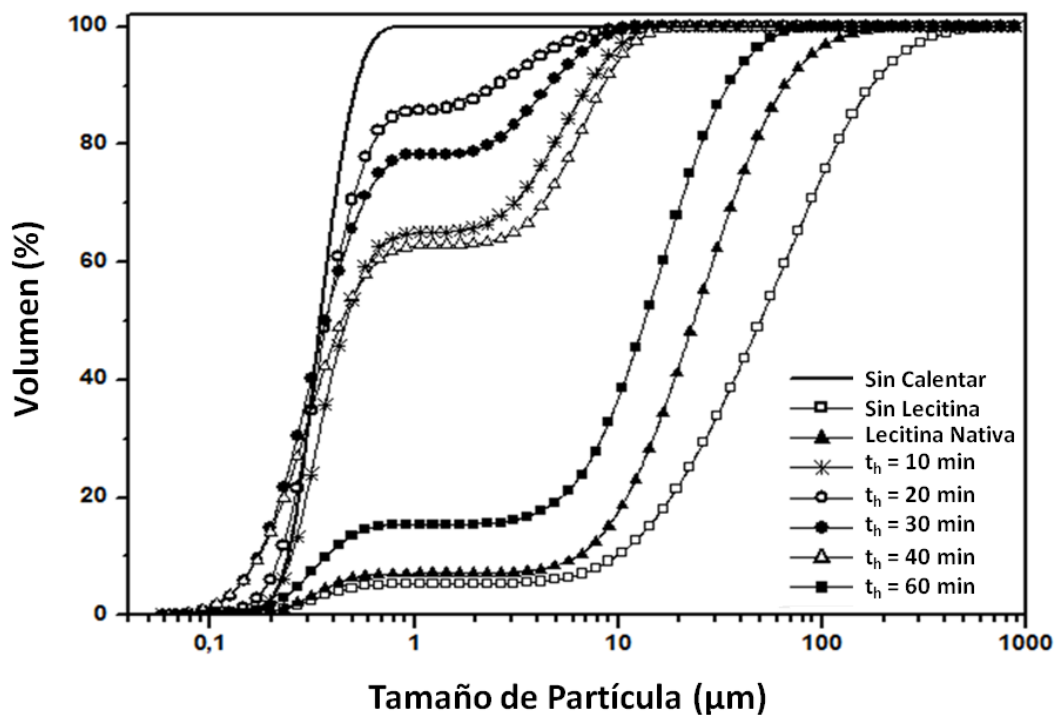


Figura 7.5. Distribución de tamaño de partícula acumulado para emulsiones de leche concentrada reconstituida con y sin agregado de lecitina cruda nativa e hidrolizada a distintos tiempos de reacción (t_h).

En línea con experimentos de Kasinos y col. (2013), las propiedades de estabilización térmica de las lecitinas se consideran resultantes de su interacción con proteínas del suero, por lo cual los lisofosfolípidos aparentemente son más efectivos que los dialquil-fosfolípidos en prevenir interacciones entre proteínas. Por otra parte, se observó un incremento gradual del tamaño de partícula cuando se adicionó lecitina hidrolizada por 40 y 60 min.

El diámetro promedio ponderado en volumen $D_{4,3}$ de la muestra de referencia (no calentada) fue de $0,36 \pm 0,01 \mu\text{m}$, elevándose a $76,3 \pm 13,4 \mu\text{m}$ luego de 35 min de calentamiento. El agregado de lecitina nativa de girasol produjo emulsiones caracterizadas por un $D_{4,3}$ de $31,4 \pm 0,81 \mu\text{m}$, mientras que el agregado de lecitina hidrolizada pudo disminuir el diámetro promedio a $2,31 \pm 0,01$; $0,88 \pm 0,04$; $1,32 \pm 0,05$; $2,77 \pm 0,21$ y $16,3 \pm 0,16 \mu\text{m}$ para tiempos de hidrólisis de 10, 20, 30, 40 y 60 min, respectivamente.

Por último, es muy importante tener en cuenta el orden en que se agregan los ingredientes a la emulsión. Debido a que la influencia de la lecitina en la estabilidad térmica de este tipo de emulsiones está relacionada a los complejos que forman los PLs y LPLs con las proteínas en la interfase, el agregado de lecitina debe realizarse previo a la homogeneización (Crujisen, 1996; Dickinson & Yamamoto, 1996; Borwankar & Case, 1997).

7.5.2.2. SISTEMA B: SUSPENSIÓN DE PROTEÍNA DE SUERO LÁCTEO

Para explicar en más detalle el efecto del grado de hidrólisis en la estabilidad térmica de emulsiones que contienen proteínas del suero, se realizó una serie de experimentos usando mezclas de WPI con lecitina modificada enzimáticamente con distintos grados de hidrólisis. Las mezclas se prepararon en buffer de imidazol y luego se calentaron durante 1 o 2 min a

80°C, enfriándose después rápidamente usando agua corriente. Luego de centrifugar por 20 min a $2900 \times g$, se determinó el contenido de proteína residual de la fase suero. La **Figura 7.6** muestra la recuperación de proteínas en la fase suero como porcentaje (m/m) del contenido de proteína en el sobrenadante para la muestra control (sin calentar). Los valores fueron calculados en base a la Ec. 7.3. Las ensayos de calentamiento y las determinaciones se realizaron por duplicado, lo que da un total de 4 muestras para cada ensayo, y se utilizó el test de Student (*t*-test) como método de comparación de medias, y las diferencias se consideraron significativas para valores de $P < 0,05$.

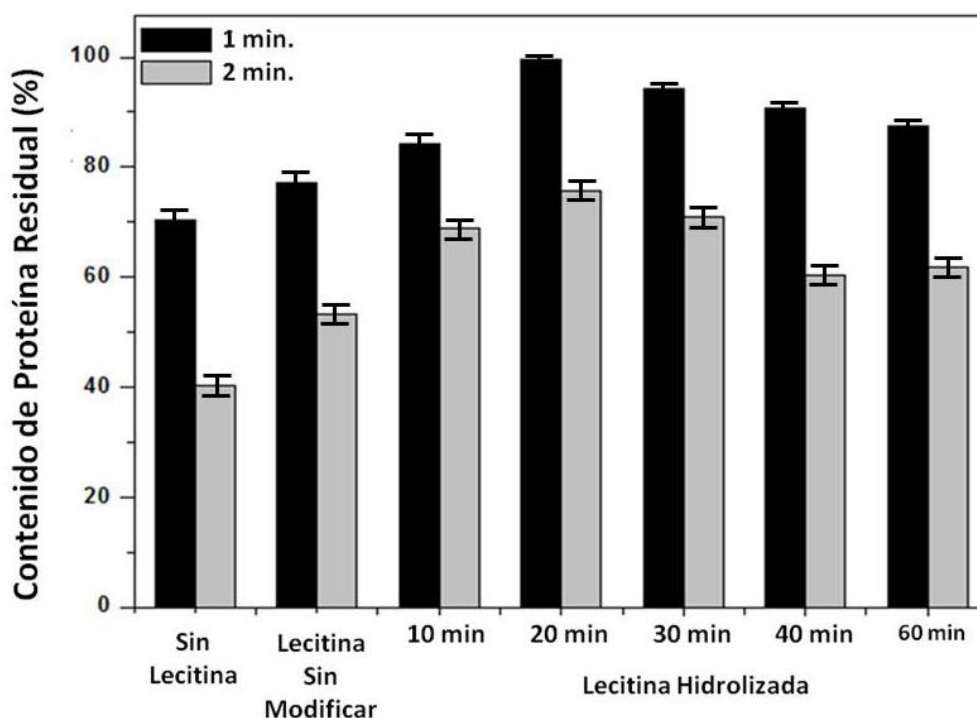


Figura 7.6. Contenido de proteína residual ($P_R\%$) en soluciones de proteína de suero lácteo (WPI) sometidas a tratamiento térmico por 1 y 2 minutos, con o sin el agregado de lecitina cruda de girasol nativa y modificada. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar ($n = 4$).

Como puede observarse, el tratamiento térmico reduce en todos los casos la recuperación de WPI en la fase suero, especialmente después de 2 min de incubación a 80 °C. La mayor reducción se observa para las muestras sin agregado de lecitina (70 y 40% para 1 y 2 min de incubación, respectivamente).

El análisis estadístico reveló que las diferencias correspondientes a $t_h = 40-60$ min no fueron significativas, tanto para las muestras con $t_c = 1$ min o como para $t_c = 2$ min. El resto de las diferencias observadas sí resultaron significativas.

Todas las muestras con agregado de lecitina hidrolizada presentaron valores más altos de recuperación que las muestras sin lecitina o con lecitina nativa. Con respecto a la influencia del grado de hidrólisis, se observa un comportamiento óptimo para el sistema con 1% de lecitina hidrolizada durante 20 min, que conservó casi el 100% de la WPI en la fase suero luego de 1 min de incubación. Para tiempos de hidrólisis mayores (30-60 min), el efecto es positivo, aunque menos marcado.

Estas observaciones proporcionan una verificación adicional de que la lecitina hidrolizada constituye una valiosa herramienta para mejorar la estabilidad térmica de mezclas de proteínas del suero y, lo que es más importante, deja claro que el grado de hidrólisis es una variable que tiene influencia en este resultado.

De modo similar, Tran Le y col. (2011) demostraron que en soluciones de WPI sometidas a calentamiento, la intensidad de la agregación era menos pronunciada en presencia de distintos surfactantes, incluyendo lecitina de soja hidrolizada, atribuyéndolo a la formación de complejos de proteínas de suero y fosfolípidos.

En la **Figura 7.7** se muestra una fotografía de los tubos con las muestras de WPI, con y sin el agregado de lecitina, incubados durante 1 y 2 minutos. Los tubos se encuentran acostados sobre el plano horizontal, y puede verse cómo cambia la fluidez de las muestras según el tiempo de calentamiento y el tipo de emulsionante agregado. La muestra sin calentar ($t_c = 0$) puede verse transparente y fluida sin presencia de precipitados. Las muestras con lecitina modificada que pueden verse en la fotografía (C), corresponden a lecitina hidrolizada por 20 min.

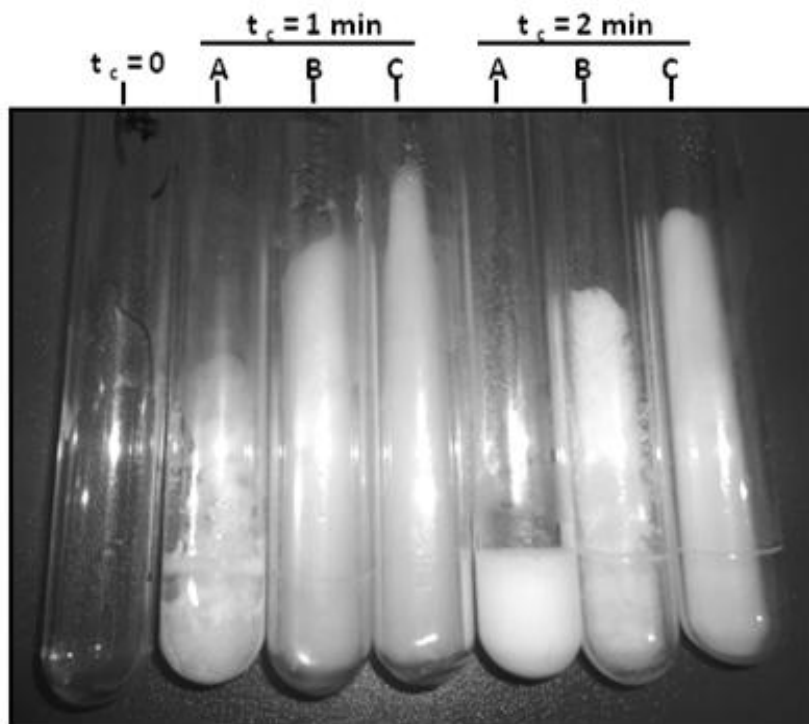


Figura 7.7. Muestras de suspensión de proteína de suero lácteo sin calentar ($t_c = 0$), y sometidas a calentamiento ($t_c = 1$ y 2 min), sin el agregado de lecitina (A), con 1% lecitina cruda nativa (B) o 1% de lecitina hidrolizada ($t_h = 20 \text{ min}$) (C).

Para las muestras sometidas a tratamiento térmico sin agregado de lecitina (A) se ve claramente la presencia de grumos para $t = 1$ min, y la formación de gel para $t = 2$ min. Las muestras con lecitina agregada fueron más fluidas, sobre todo las muestras con lecitina hidrolizada (C), lo cual es otro indicativo de la estabilidad al tratamiento térmico.

Finalmente, con el propósito de mostrar la diferente efectividad entre la lecitina nativa e hidrolizada en la estabilidad térmica de soluciones de WPI, se realizaron ensayos de reología oscilatorios. Este tipo de ensayos han sido utilizados previamente por otros autores para investigar el efecto de surfactantes en la gelificación inducida térmicamente de proteína del suero (Chen & Dickinson, 1998; Chen y col., 2000; Dickinson & Yamamoto, 1996; Tran Le y col., 2011).

En este tipo de ensayos, la viscosidad compleja (η^*) puede definirse como:

$$\eta^* = G^* / \omega \quad (7.4)$$

Donde G^* es el módulo complejo, que incluye las componentes elástica y viscosa de la emulsión o gel, y ω es la frecuencia de deformación.

La **Figura 7.8** muestra los cambios en las propiedades reológicas de una solución de WPI al 2,75% en presencia de 1% de lecitina de girasol nativa o hidrolizada ($t_h = 20$ min, $\%H_{PL} = 76$). Las curvas de gelificación muestran que la lecitina hidrolizada redujo significativamente el módulo complejo G^* , tanto en el período de calentamiento como en el de enfriamiento, lo que significa una reducción en la viscosidad compleja.

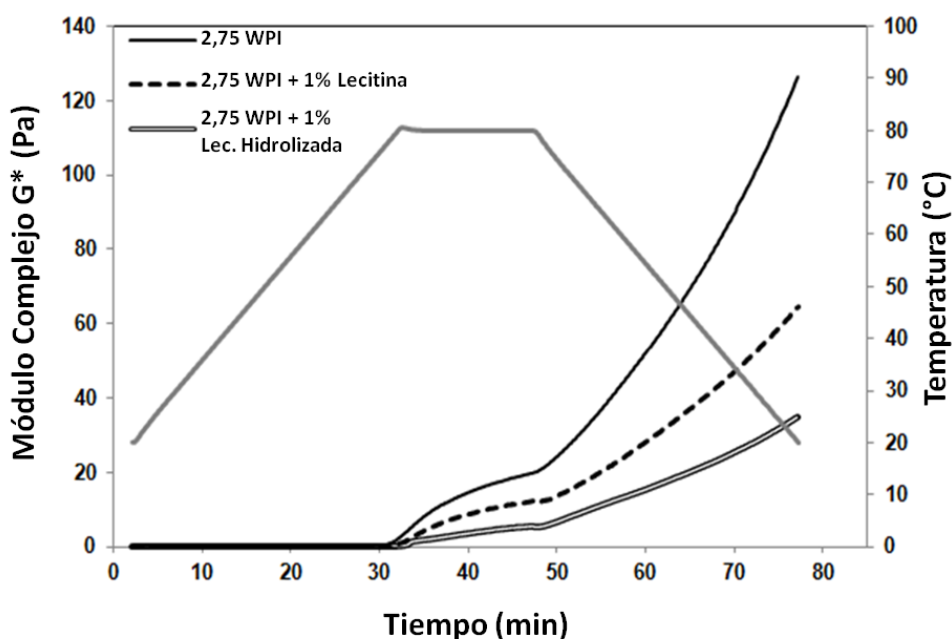


Figura 7.8. Módulo complejo G^* para soluciones de proteína de suero lácteo (WPI) con y sin el agregado de lecitina cruda nativa e hidrolizada ($t_h = 20$ min).

De manera similar, Tran Le y col. (2007) describen que la lecitina hidrolizada es muy efectiva en reducir el diámetro promedio de mezclas de micelas de caseína y proteínas del suero luego de 15 min de calentamiento a 80 °C. Además, a partir de la **Figura 7.8** también es evidente que la lecitina nativa redujo la fuerza del gel de WPI, postulándose que las soluciones de proteína del suero son más resistentes a la coagulación inducida térmicamente; sin embargo, el impacto no fue tan marcado como en el caso de la lecitina hidrolizada.

Las observaciones anteriores proporcionan un fuerte indicio de que las propiedades de estabilidad térmica de emulsiones y soluciones que contienen proteínas del suero están ampliamente influenciadas por el tipo de lecitina utilizada. Kristensen y col. (1997) y de manera similar Kasinos y col. (2013) concluyeron que la interacción entre fosfolípidos y β -

lactoglobulina es dependiente de la hidrofiliidad de los primeros, y por lo tanto del tipo de grupo polar “cabeza” del fosfolípido, así como del grado de saturación de sus ácidos grasos.

En este caso la lecitina hidrolizada presenta un alto contenido de LPLs, lo que le otorga un carácter hidrofílico mayor que el de la lecitina nativa, lo que puede explicar los buenos resultados obtenidos con la lecitina modificada.

7.6. CONCLUSIONES

Los experimentos de estabilidad térmica revelaron que tanto la lecitina de girasol nativa como hidrolizada redujeron la tendencia a la coagulación en los sistemas estudiados, lo cual puede atribuirse a la formación de complejos entre proteínas del suero y fosfolípidos (o lisofosfolípidos).

En primer lugar, la incorporación de lecitina de girasol nativa a emulsiones de leche concentrada reconstituida sometidas a calentamiento a 121 °C durante 25 min, demostró una notable reducción en la tendencia a la coagulación, con un efecto proporcional a la concentración añadida. Las mediciones de tamaño de partícula revelaron que la adición de la máxima concentración de lecitina (0,3% m/m) resultó en emulsiones con características de tamaño similares a las emulsiones no sometidas a calentamiento.

Al incrementar el tiempo de calentamiento a 35 min y comparar la lecitina nativa e hidrolizada, esta última mostró ser más efectiva en mejorar la estabilidad térmica de emulsiones de leche concentrada reconstituida y soluciones de WPI, lo cual podría explicarse a partir de su mayor contenido de lisofosfolípidos.

Además, la hidrólisis enzimática de lecitina nativa de girasol con PLA₁ durante diferentes intervalos de tiempo mostró que el grado de hidrólisis puede jugar un papel decisivo en la estabilidad térmica de emulsiones y soluciones con proteínas de suero. Se encontró un tiempo óptimo de hidrólisis de 20 min, por encima del cual el efecto positivo de la lecitina hidrolizada se reducía. Este tiempo de hidrólisis corresponde a la muestra con mayor contenido de LPLs, por lo que esto parece jugar un papel determinante en los fenómenos de agregación inducida térmicamente. Dado que se observó una dependencia de la estabilidad

térmica experimental con respecto al contenido de lisofosfolípidos en las lecitinas modificadas, el efecto benéfico de la hidrólisis enzimática a tiempos cortos se explicó como resultado de la mayor hidrofiliidad de los monoalquil-fosfolípidos (LPLs), lo que concuerda con lo reportado por algunos autores (McCrae, 1999; Van der Meeren y col., 2005; Tran Le y col., 2007, 2011; Cabezas y col., 2011).

7.7. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

7.7.1. PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS:

“Effect of hydrolyzed sunflower lecithin on the heat-induced coagulation of recombined concentrated milk emulsions”. Kasinos, M; **Goñi, M. L**; Nguyen, M. T; Sabatino, P; Martins, J. C; Dewettinck, K; Van der Meeren, P.

Artículo original; International Dairy Journal; 2014. Vol 38. pp 187-194.

7.7.2. PRESENTACIONES EN CONGRESOS:

“Efecto del agregado de lecitina cruda de girasol en la estabilidad térmica de emulsiones de leche reconstituida”. **Goñi, M. L**; Kasinos, M; Van der Meeren, P; Carelli, A.

Póster y Trabajo Extendido presentado en la “III Reunión Interdisciplinaria de Tecnología y Procesos Químicos - RITeQ 2014”. Los Cocos, Córdoba, Argentina. 2014.

“Effect of hydrolyzed sunflower lecithin on the heat-induced coagulation of recombined evaporated milk emulsions”. Kasinos, M; **Goñi, M. L**; Sabatino, P; Van der Meeren, P.

Poster presentado en 8th NIZO Dairy Conference, “Functional Enzymes for Dairy Applications”. Papendal, Países Bajos. 2013.

7.8. BIBLIOGRAFÍA

- Anema, S. G. (1997).** The effect of chymosin on k-casein-coated polystyrene latex particles and bovine casein micelles. *International Dairy Journal*, 7, 553–558.
- Anema, S. G., & Li, Y. (2003).** Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size. *Journal of Dairy Research*, 70, 73–83.
- Bergenståhl, B. A., & Alander, J. (1997).** Lipids and colloidal stability. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2(6), 590–595.
- Borwankar, R. P., & Case, S. E. (1997).** Rheology of emulsions, foams and gels. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2(6), 584–589.
- CAA. (2010).** Capítulo VIII: Alimentos Lácteos. En *Código Alimentario Argentino*. http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_VIII.pdf (acceso Junio 2014)
- Cabezas, D. M. (2010).** *Modificaciones Tecnológicas de Lecitinas de Girasol. Aplicaciones en el Área Alimentaria*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Cabezas, D. M., Madoery, R., Diehl, B. W. K., & Tomás, M. C. (2011).** Application of enzymatic hydrolysis on sunflower lecithin using a pancreatic PLA2. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 443–446.
- Chen, J., & Dickinson, E. (1998).** Viscoelastic properties of protein-stabilized emulsions: effect of protein-surfactant interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 91–97.
- Chen, J. S., Dickinson, E., Langton, M., & Hermansson, A. M. (2000).** Mechanical properties and microstructure of heat-set whey protein emulsion gels: effect of emulsifiers. *Food Science and Technology*, 33, 299–307.
- Corredig, M., & Dalgleish, D. G. (1996).** Effect of temperature and pH on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. *Food Research International*, 29(1), 49–55.
- Crujisen, J. M. M. (1996).** *Physical Stability of Caseinate-Stabilized Emulsions During Heating*. Tesis Doctoral. Univesidad de Agricultura de Wageningen, Países Bajos.

- Dickinson, E., & Yamamoto, Y. (1996).** Effect of lecithin on the viscoelastic properties of β -lactoglobulin-stabilized emulsion gels. *Food Hydrocolloids*, 10(3), 301–307.
- Dissanayake, M., & Vasiljevic, T. (2009).** Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1387–97.
- Fang, Y., & Dalgleish, D. G. (1996).** Comparison of the effects of three different phosphatidylcholines on casein-stabilized oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(4), 437–442.
- Guiotto, E. N. (2014).** *Aplicación de Subproductos de Chía (Salvia hispanica L.) y Girasol (Helianthus annuus L.) en Alimentos*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Hardy, E. E., Sweetsur, A. W. M., West, I. G., & Muir, D. D. (1985).** Heat stability of concentrated milk: enhancement of initial heat stability by incorporation of food grade lecithin. *International Journal of Food Science & Technology*, 20, 97–105.
- Hasenhuettl, G. L. (2008).** *Food Emulsifiers and Their Applications* (2nd ed.). Springer, New York.
- Jeurnink, T. J. M., & Dekruif, K. G. (1993).** Changes in milk on heating: viscosity measurements. *Journal of Dairy Research*, 60, 139–150.
- Jost, R., Dannenberg, F., & Rosset, J. (1989).** Heat-set gels based on oil/water emulsions: an application of whey protein functionality. *Food Microstructure*, 8, 23–28.
- Kasinos, M., Sabatino, P., Vanloo, B., Gevaert, K., Martins, J. C., & Van der Meeren, P. (2013).** Effect of phospholipid molecular structure on its interaction with whey proteins in aqueous solution. *Food Hydrocolloids*, 32(2), 312–321.
- Kasinos, M., Tran Le, T., & Van der Meeren, P. (2014).** Improved heat stability of recombined evaporated milk emulsions upon addition of phospholipid enriched dairy by-products. *Food Hydrocolloids*, 34, 112–118.

- Kristensen, A., Nylander, T., Paulsson, M., & Carlsson, A. (1997).** Calorimetric studies of interactions between β -lactoglobulin and phospholipids in solutions. *International Dairy Journal*, 7(1), 87–92.
- McCrae, C. H. (1999).** Heat stability of milk emulsions: phospholipid-protein interactions. *International Dairy Journal*, 9(3-6), 227–231.
- McSweeney, S. L., Healy, R., & Mulvihill, D. M. (2008).** Effect of lecithin and monoglycerides on the heat stability of a model infant formula emulsion. *Food Hydrocolloids*, 22(5), 888–898.
- Oldfield, D. J., Singh, H., Taylor, M. W., & Pearce, K. N. (2000).** Heat-induced interactions of β -lactoglobulin and α -lactalbumin with the casein micelle in pH adjusted skim milk. *International Dairy Journal*, 10, 509–518.
- Pelegri, D. H. G., & Gasparetto, C. A. (2005).** Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT - Food Science and Technology*, 38(1), 77–80.
- Penci, M. C. (2009).** *Modificación Enzimática de Lecitinas*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur, Argentina.
- Schacterle, G. R., & Pollac, R. L. (1973).** A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. *Analytical Biochemistry*, 51, 654 – 655.
- Singh, H. A. R. J. (2004).** Heat stability of milk. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2), 111–119.
- Sünder, a, Scherze, I., & Muschiolik, G. (2001).** Physico-chemical characteristics of oil-in-water emulsions based on whey protein-phospholipid mixtures. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 21(1-3), 75–85.
- Tran Le, T., El-Bakry, M., Neiryck, N., Bogus, M., Hoa, H. D., & Van der Meeren, P. (2007).** Hydrophilic lecithins protect milk proteins against heat-induced aggregation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60(2), 167–173.
- Tran Le, T., Sabatino, P., Heyman, B., Kasinos, M., Dinh, H. H., Dewettinck, K., Martins, J., Van Der Meeren, P. (2011).** Improved heat stability by whey protein-surfactant interaction. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 594–603.

- Van der Meeren, P., El-Bakry, M., Neiryck, N., & Noppe, P. (2005).** Influence of hydrolysed lecithin addition on protein adsorption and heat stability of a sterilised coffee cream simulant. *International Dairy Journal*, 15(12), 1235–1243.
- Verheul, M., Roefs, S. P. F. M., & Kruif, K. G. De. (1998).** Kinetics of heat-induced aggregation of β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8561(46), 896–903.
- WHO, & FAO. (2011).** CODEX Standards for Milk and Milk Products. En *CODEX ALIMENTARIUS* (2nd ed.). <http://www.fao.org/docrep/015/i2085e/i2085e00.pdf> (acceso Junio 2014)
- Yamamoto, Y., & Araki, M. (1997).** Effects of lecithin addition in oil or water phase on the stability of emulsions made with whey proteins. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61, 1791–1795.

CAPÍTULO VIII:
CONCLUSIONES GENERALES
Y TRABAJOS FUTUROS

8. CONCLUSIONES GENERALES Y TRABAJO FUTURO

8.1. CONCLUSIONES GENERALES

En esta tesis se ha presentado un estudio sobre la hidrólisis enzimática de lecitina cruda de girasol, utilizando un preparado enzimático (Lecitase® Ultra), con actividad PLA₁. Este estudio comprendió la determinación experimental de las condiciones óptimas de reacción; la caracterización de la materia prima y los productos obtenidos a distintos tiempos de hidrólisis mediante la implementación de diferentes métodos analíticos, incluyendo el desarrollo de una técnica de ³¹P-NMR; y la evaluación de las propiedades surfactantes de dichos productos en la estabilización de emulsiones lácteas sometidas a tratamiento térmico, relacionando los resultados con la composición de las muestras.

Se encontró que las **condiciones óptimas** de reacción para la hidrólisis de lecitina cruda de girasol con Lecitase® Ultra, fueron: T = 50 °C, pH = 5, y en medio acuoso libre de solvente. Estos resultados concuerdan con datos reportados posteriormente por distintos autores. El

uso de un sistema libre de solvente para la hidrólisis enzimática representa una ventaja, ya que se evitan medidas adicionales de seguridad y etapas posteriores de separación del solvente para obtener productos aptos para su uso como aditivos alimentarios; factores que incrementan los costos de producción a nivel industrial.

Debido a que las lecitinas vegetales son mezclas complejas de diferentes componentes que contribuyen a sus propiedades emulsionantes en conjunto, y de manera diferencial, es importante contar con **técnicas analíticas** confiables que permitan la identificación de todas las especies presentes. Los lípidos neutros y ácidos grasos fueron determinados satisfactoriamente mediante técnicas cromatográficas (CGC-FID). Por otra parte, debido a las limitaciones de la metodología disponible de HPLC-UV para el análisis de PLs y LPLs en el tipo de muestras estudiado en esta tesis, se desarrolló una técnica analítica mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de fósforo ($^{31}\text{P-NMR}$). La técnica desarrollada demostró ser adecuada para la determinación de PLs y LPLs e incluso presentó la ventaja de identificar y cuantificar GPLs, permitiendo el seguimiento de la hidrólisis de LPLs que son los principales compuestos de interés en las lecitinas modificadas. Esta metodología presenta una serie de ventajas adicionales ya que es un método no destructivo que además no requiere la separación, purificación o derivatización previa de los analitos; y utiliza un único estándar para la cuantificación de todas las especies, sin la necesidad de realizar curvas de calibración.

La hidrólisis del ácido linoleico (poliinsaturado, normalmente en cantidad mayoritaria en la posición 2 de la molécula); el aumento observado en la concentración de 1-monoglicéridos y

1,3- diglicéridos; y la hidrólisis de lisofosfolípidos corroborada por la aparición de glicerofosfolípidos en el medio de reacción, sugieren la ocurrencia de la **acil-migración**. Esta hipótesis también es avalada por lo reportado en bibliografía para medios de reacción con alto contenido de agua.

Además de su actividad como PLA₁, los resultados obtenidos evidenciaron una acción **lipasa** de la enzima Lecitase® Ultra, hidrolizando a los lípidos neutros presentes en la lecitina cruda, lo que concuerda con lo informado por varios autores en la literatura. Esta hidrólisis fue más importante luego de una significativa disminución de los fosfolípidos (%H_{PL} ~ 90) a tiempos de reacción mayores a 1 h. Esto concuerda con lo reportado por algunos autores que han encontrado que la fosfatidilcolina (fosfolípido mayoritario en la lecitina de girasol) inhibe la actividad lipasa de Lecitase® Ultra.

En las condiciones de reacción estudiadas, se observó que la **hidrólisis de PLs** ocurre casi en su totalidad durante la primera hora de reacción, obteniéndose un grado de hidrólisis de fosfolípidos de aproximadamente 90%. Dentro de este periodo la concentración de LPLs alcanzó un máximo a los 20 min y luego comenzó a disminuir, por hidrólisis a GPLs.

Con respecto a las **aplicaciones** de las lecitinas modificadas, los experimentos de coagulación térmica en emulsiones lácteas revelaron que tanto la lecitina de girasol nativa como hidrolizada mejoraron la estabilidad térmica, lo cual puede atribuirse a la formación de complejos entre proteínas del suero y fosfolípidos y/o lisofosfolípidos. Los ensayos realizados demostraron que las emulsiones con 0,3% de lecitina nativa adicionada sometidas

a tratamiento térmico por 25 min, presentan características reológicas y de estabilidad similares a las emulsiones no sometidas a calentamiento. Por otro lado, al incrementar el tiempo de calentamiento a 35 min, se observó que la lecitina hidrolizada presentó un mayor efecto estabilizante que la lecitina nativa, a igual concentración. Además el mejor resultado se obtuvo con la lecitina modificada con mayor contenido de LPLs (20 min de reacción; %H_{PL} ~ 75), lo que sugiere una relación directa entre el contenido de estos compuestos y las propiedades estabilizantes de la lecitina modificada.

En conclusión, el desarrollo de esta tesis pretende aportar conocimientos que contribuyan al aprovechamiento de lecitinas provenientes del proceso de refinación del aceite de girasol, utilizando una tecnología limpia como la enzimática. La tecnología propuesta puede constituir una alternativa atractiva para revalorizar un subproducto industrial de un sector muy importante en Argentina, como es el complejo oleaginoso, combinándose el uso de una materia prima no-GMO, con el uso de un proceso limpio, para generar productos con múltiples funcionalidades, de gran interés en la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos.

8.2. TRABAJOS FUTUROS

Las muestras obtenidas a diferentes tiempos de hidrólisis presentan diferencias en su composición, lo que seguramente otorgará características emulsionantes y dispersantes propias a cada una de ellas. Una futura línea de trabajo radica en la ***aplicación de las***

diferentes muestras a otros sistemas, como pueden ser productos panificados donde se cree que las lisolecitinas ayudan a prevenir la retrogradación del almidón formando complejos LPL-amilosa.

También podría considerarse el **fraccionamiento** posterior de la lecitina modificada, obteniendo por un lado la fase de lípidos neutros con un alto contenido de MGs y DGs, y por otro lado, la fracción polar con un alto contenido de LPLs. Ambas fracciones presentarán características emulsionantes propias para distintas aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos.

Se propone también investigar mecanismos que permitan **disminuir la reacción de acil-migración** de manera de optimizar la cantidad de LPLs obtenida, evitando su posterior hidrólisis. Esto puede mejorarse efectuando la hidrólisis en medios semisólidos. Esto implica trabajar en condiciones de alta concentración de sustrato y enzima en agua y una buena agitación. Además, el producto obtenido de esta manera presentaría un bajo contenido de agua; la utilización de este tipo de sistemas a escala industrial puede resultar una alternativa más económica que el empleo de sistemas con alto tenor acuoso. Esto es muy importante desde el punto de vista tecnológico y económico dado que la eliminación de agua es un proceso caro y muy lento, considerando que se requiere trabajar a bajas temperaturas para evitar deterioros en el producto.

Otra manera de reducir los costos de proceso a nivel industrial es la **utilización de enzimas inmovilizadas**. Por lo tanto se propone como trabajo futuro continuar con el estudio de

mecanismos de inmovilización que no reduzcan la actividad de la enzima, permitiendo además, la implementación de un proceso continuo y con mejor control de las condiciones de reacción en planta.

Por otro lado podría encararse un estudio sistemático del **mecanismo de reacción** de la hidrólisis de fosfolípidos con Lecitase® Ultra, así como también de su actividad como lipasa, ya que la obtención de monoglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos a partir de aceite, si bien requiere procesos posteriores de purificación, puede resultar de gran interés debido al alto valor de estos productos.

Por último, sería de interés avanzar en el estudio de las potenciales **aplicaciones de las lecitinas modificadas en la industria farmacéutica y cosmética**. Por ejemplo la glicerofosfatidilcolina (GPC) es un potencial nutriente para su uso como aditivo alimentario y aplicaciones médicas, por lo que su obtención a partir de la hidrólisis total de lecitinas crudas podría ser una alternativa muy atractiva desde el punto de vista comercial.